

Microscopie : Techniques de contraste

HERVÉ SAUER - JOËLLE SURREL

Table des matières

I. Présentation	3
II. Cours	4
1. Le microscope polarisant.....	4
1.1. Observations en transmission.....	4
1.2. Observations en réflexion.....	9
2. Fond noir et contraste de phase.....	10
2.1. Rappels sur le filtrage des fréquences spatiales.....	10
2.2. Défaut de mise au point en éclairage spatialement cohérent.....	12
2.3. Strioscopie et fond noir.....	13
2.4. Contraste de phase.....	16
3. Techniques interférométriques.....	21
3.1. Généralités.....	21
3.2. L'objectif de Mirau.....	22
3.3. Contraste interférentiel différentiel 'NOMARSKI'.....	26
4. Microscopie de fluorescence.....	32
4.1. Principe de l'épifluorescence.....	33
III. Etudes de cas	36
1. Technique utilisant la polarisation.....	36
1.1. Diascopie.....	36
1.2. En épiscopie.....	38
2. Fond noir ou strioscopie.....	39
2.1. Diascopie.....	39
2.2. Épiscopie.....	40
3. Technique du contraste de phase.....	40
3.1. Diascopie.....	40
4. Contraste interférentiel différentiel DIC en épiscopie.....	41
4.1. Épiscopie.....	41
IV. Exercices	43
1. Cheminement des rayons à l'intérieur d'un prisme de Wollaston.....	43
2. Contraste interférentiel dans le cas d'un microscope en transmission.....	44
Solution des exercices	45
Glossaire	51
Bibliographie	52

I.Présentation

Module :

Optique instrumentale, microscopie

Auteur(s) :

Hervé SAUER¹&Joëlle SURREL² - Institut Optique Graduate School & IUT St Étienne

Résumé :

-

Mots-clés :

Microscope polarisant, éclairage orthoscopique, éclairage conoscopique, optique de Fourier, contraste de phase, strioscopie, fond noir, objectif de Mirau, contraste interférentiel différentiel (DIC), prisme de Wollaston, prisme de Nomarski, épifluorescence

Pré-requis :

Fonctionnement de base du microscope et de son éclairage comme donné par le grain M11G1 ainsi que des bases avancées d'optique (optique géométrique, optique physique, interférences, polarisation, biréfringence, optique de Fourier).

Objectif(s) pédagogique(s) :

Appréhender les techniques qui améliorent le contraste des images d'objets microscopiques usuels en utilisant la polarisation, le filtrage des fréquences spatiales, les interférences ou encore la fluorescence. (Principes physiques et mise en œuvre pratique sur les microscopes commerciaux actuels).

Plan du cours :

- Introduction
- Le microscope polarisant
- Fond noir et contraste de phase
- Techniques interférométriques
- Microscopie de fluorescence
- Conclusion

Conception & production :

PRN - Le Mans Université

Licence :

Licence GNU³

1 - herve.sauer@institutoptique.fr

2 - joelle.surrel@univ-st-etienne.fr

3 - <http://www.gnu.org/licenses/fdl.txt>

II. Cours

De nombreux objets microscopiques d'intérêt biologique ou technologique sont intrinsèquement transparents ou de réflectivité similaire à leur entourage et donnent donc en observation simple au travers d'un microscope une image quasi-uniforme inexploitable. Des techniques de coloration ou de révélation "chimiques" peuvent éventuellement être utilisées mais leur emploi est restreint par des difficultés de mise en œuvre ou par les modifications de l'objet étudié qu'elles entraînent inéluctablement (altération du métabolisme des cellules vivantes, attaque irréversible des surfaces...)

Cependant ces "imperceptibles" objets bruts, s'ils modifient peu l'intensité de la lumière d'éclairage qu'ils transmettent ou réfléchissent, changent usuellement de manière tangible d'autres propriétés de celle-ci, comme la phase ou la polarisation. Des dispositifs appropriés insérés dans le microscope peuvent donc transformer ces variations, non décelables par l'œil ou les détecteurs usuels, en modulation visible de l'intensité lumineuse. Quelques méthodes sont maintenant très "classiques" et les dispositifs pour les mettre en œuvre sont proposés par tous les grands constructeurs de microscope, tant pour l'observation par transmission (*diascopie*, microscopes dits "biologiques") que pour l'observation par réflexion (*épiscopie*, microscopes dits "métallographiques").

Les techniques de contraste sont couramment utilisées pour de nombreux types d'observation. Elles sont même indispensables dans de nombreux domaines scientifiques, techniques ou industriels allant de l'analyse médicale de routine au contrôle de matériaux de pointe. Il est donc important de connaître ces techniques et de comprendre les méthodes optiques sous-jacentes très diverses et intéressantes qu'elles mettent en œuvre. Ce grain « *Techniques de contraste en observation microscopique* » du module « *Microscopie optique* » a pour objet de présenter les principaux éléments de ce domaine. Il fait suite au grain « *Principes et utilisations de base du microscope*⁴ » du même module, sur lequel il s'appuie pour les définitions et concepts de base de microscopie qui ne seront pas repris ici.

1. Le microscope polarisant

De nombreux échantillons modifient la polarisation de la lumière incidente, transmise ou réfléchi, par biréfringence, pouvoir rotatoire, dichroïsme, diffusion, ... Il est dès lors utile de pouvoir mettre en évidence ou de différencier les différentes parties d'un échantillon hétérogène, voire de les identifier par mesure précise des propriétés optiques. Les exemples les plus courants sont les coupes minces de cristaux, très utilisées pour l'identification chimique ou géologique de matériaux, et les surfaces polies de métaux ou matériaux polycristallins, souvent observées à des fins de caractérisation métallographique. Suivant les buts visés (visualisation ou identification), différentes méthodes de polarisation de complexité variable peuvent être utilisées.

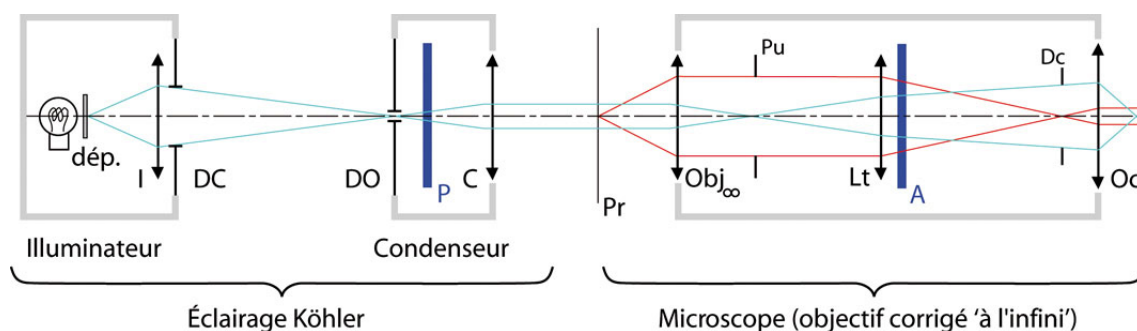
1.1. Observations en transmission

a) Microscopie en éclairage orthoscopique

C'est une méthode très simple à mettre en œuvre qui permet la mise en évidence et la différenciation des matériaux transparents biréfringents. Le faisceau d'éclairage, collimaté et normal à la surface de l'échantillon (d'où le nom d'éclairage orthoscopique) est polarisé, le plus

4 - http://prn1.univ-lemans.fr/prn1/siteheberge/optique/M11G1_JSurrelHSauer/co/M11G1_web.html

souvent rectilignement, par un polariseur inséré dans le bloc d'éclairage ; un analyseur est placé dans le microscope en aval de la préparation. En pratique, l'éclairage collimaté est simplement réalisé par l'éclairage Köhler avec un diaphragme d'ouverture très petit (cf. grain *Principes et utilisations de base du microscope*⁵). Voir Fig.1.



dép. : Dépoli

I : Optique de l'illuminateur

DC : Diaphragme de Champ (très fermé)

DO : Diaphragme d'Ouverture

P : Polariseur (orientable)

C : Optique du condenseur

Pr : Préparation (transparente) observée, sur porte échantillon orientable

Obj_∞ : Objectif du microscope (corrigé à l'∞)

Pu : Pupille de l'objectif

Lt : "lentille" de tube

A : Analyseur (orientable)

Dc : Diaphragme de champ de l'oc.

Oc : Oculaire

Figure 1 : Principe du microscope polarisant en transmission (éclairage orthoscopique)

Polariseur, analyseur et préparation sont en général précisément orientables indépendamment autour de l'axe optique du microscope à l'aide de mécanismes appropriés intégrés au statif (voir Fig.2).

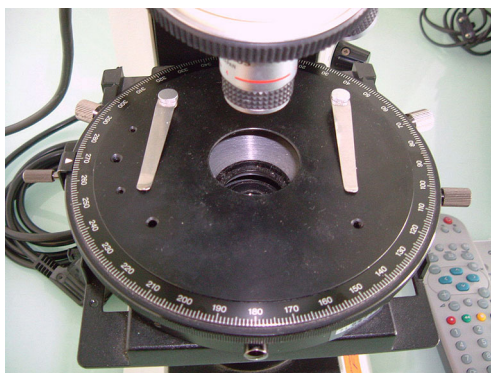



Figure 2 : Exemple de platine porte échantillon précisément orientable d'un microscope polarisant

Dans le cas général, la biréfringence des objets de la préparation observée au microscope polarisant se traduit, en lumière blanche, par l'apparition de couleurs nettement visibles permettant de distinguer et localiser les différents constituants de l'échantillon (Fig.3). Les couleurs observées sont produites par l'apparition de spectres cannelés dus à des interférences en lumière polarisée. Lorsqu'une zone homogène de l'échantillon a ses lignes neutres orientées à $\pm 45^\circ$ du polariseur, et que l'analyseur est croisé ou parallèle avec le polariseur, la couleur perçue correspond à une des teintes de Newton . (Voir cours d'optique physique et de biréfringence et polarisation, par exemple [[Principles of Optics]]).

5 - http://prn1.univ-lemans.fr/prn1/siteheberge/optique/M11G1_JSurrelHSauer/co/M11G1_web.html

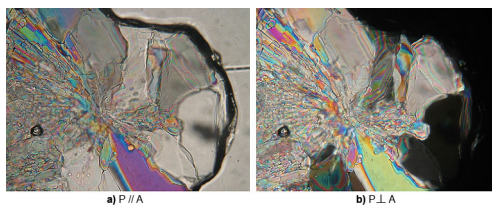


Figure 3 : Cristaux d'acide citrique. Microscope polarisant en éclairage orthoscopique

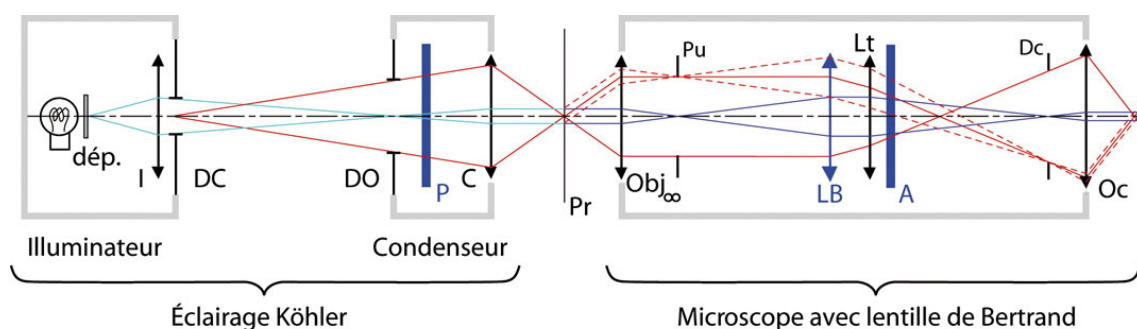
b) Identification de matériaux ('polarisation quantitative' en éclairage orthoscopique)

Lorsque l'échantillon observé est une lame mince à faces parallèles polies d'épaisseur connue, il est possible de le caractériser plus en détail. En effet, toute lame à faces parallèles d'un matériau homogène anisotrope, quelle que soit sa nature uniaxe ou biaxe et quelle que soit l'orientation de ses axes principaux, se comporte comme une lame retardatrice dont les caractéristiques (orientation des lignes neutres et différence de chemin optique entre les deux ondes planes polarisées rectilignement associées à chaque ligne neutre) dépendent de la biréfringence du matériau et de son orientation (voir [[Principles of Optics]]). Comme en éclairage orthoscopique, le microscope polarisant s'apparente à un polariscope, toutes les méthodes classiques d'analyse de la polarisation peuvent y être transposées. On trouve ainsi le compensateur de **Sénarmont** constitué de l'association d'une lame $\lambda/4$ et d'un polariseur, le compensateur de **Soleil**, le compensateur de **Babinet**, ... Les mesures peuvent fournir des renseignements très riches pour analyser voire identifier la nature d'un échantillon. Cependant la polarisation quantitative en microscopie est un travail délicat demandant du matériel très spécialisé (microscope de moyen ou haut de gamme *équipé des équipements optionnels appropriés*). En particulier, il faut, pour des mesures de qualité, travailler avec des objectifs spéciaux dit "sans tension" dont les lentilles réalisées par des méthodes spécifiques sont montées dans des barillets opto-mécaniques particuliers qui évitent les contraintes, afin de ne pas faire apparaître de biréfringence induite qui fausserait les mesures.

Parmi ces méthodes, celle dite 'des teintes de **Newton**', est la plus simple à mettre en œuvre et elle est, en particulier, très souvent utilisée en géologie pour identifier des roches à partir d'une coupe polie d'épaisseur connue. Elle est décrite plus en détail dans la partie *Étude de cas* de ce grain.

c) Microscopie en éclairage conoscopique

Cette méthode, appelée "*conoscopie*", est utilisée en complément de la méthode d'éclairage orthoscopique pour la caractérisation de matériaux biréfringents en lame mince à faces parallèles, car la seule connaissance de la direction des axes neutres et de la valeur numérique de la différence de marche entre les deux polarisations propres est en général insuffisante pour identifier les matériaux sans ambiguïté. Elle consiste à éclairer une partie uniforme de l'échantillon avec un cône de lumière polarisée (d'où le nom de la méthode) et d'observer derrière un analyseur les interférences dites "en lumière convergente" qui se forment à l'infini ou au foyer d'un objectif [[Principles of Optics]]. D'un point de vue pratique, le faisceau conique d'éclairage est produit par l'éclairage **Köhler** avec un diaphragme d'ouverture très ouvert et un diaphragme de champ suffisamment fermé pour restreindre l'illumination à la zone d'intérêt placée au centre du champ. La figure d'interférences en lumière convergente se forme alors au foyer image de l'objectif du microscope. Pour l'observer à l'œil en sortie de l'oculaire du microscope, il faut ajouter un objectif convergent, dit '*lentille de Bertrand*'[⊗], dans le corps du microscope pour rejeter son image à l'infini (Fig.4). Il est à souligner que cette méthode ne donne plus une image de la préparation, mais une figure complexe (Fig.5cd) permettant de caractériser les propriétés de biréfringence de la zone uniforme de l'échantillon préalablement sélectionnée en éclairage orthoscopique (Fig.5ab).

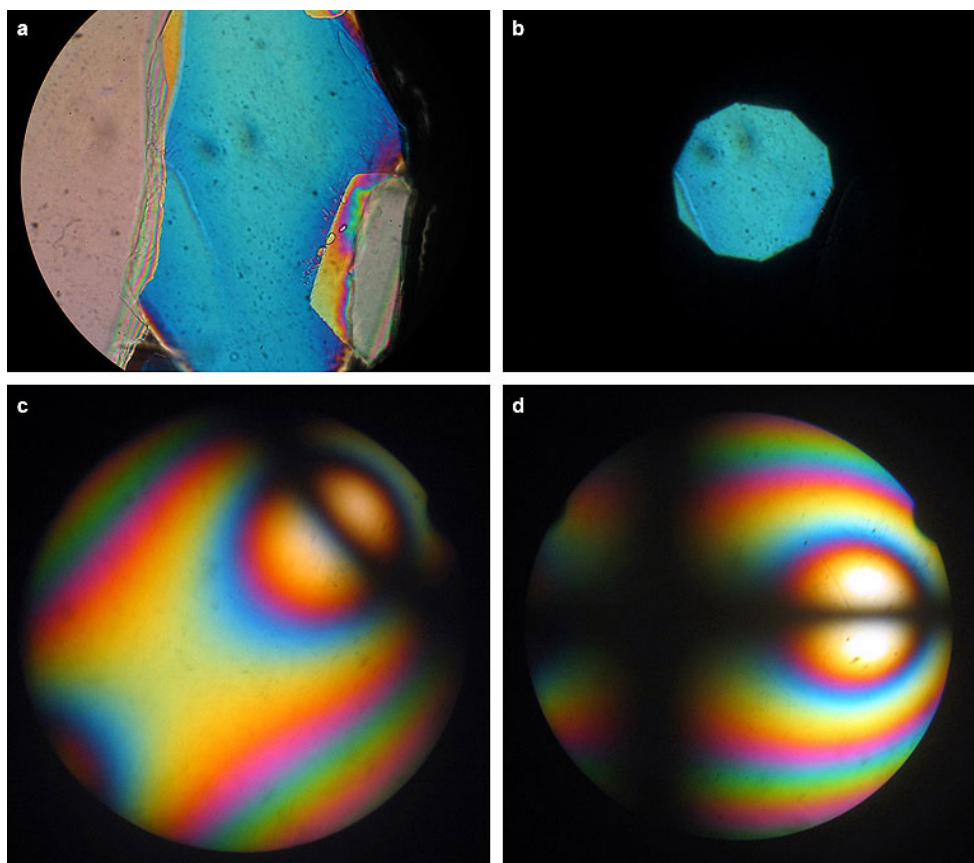


dép. :	Dépoli	Pr :	Préparation (transparente) observée
I :	Optique de l'illuminateur	Obj _∞ :	Objectif du microscope (corrigé à l' ∞)
DC :	Diaphragme de Champ (très fermé)	Pu :	Pupille de l'objectif (plan focal image)
DO :	Diaphragme d'Ouverture	LB :	"lentille" de Bertrand (amovible); son foyer objet coïncide avec Pu.
P :	Polariseur	Lt :	"lentille" de tube
C :	Optique du condenseur	A :	Analyseur
		Dc :	Diaphragme de champ de l'oc.
		Oc :	Oculaire

Figure 4 : Principe du microscope polarisant en observation conoscopique

Rappel

Sur les microscopes non équipés d'une lentille de Bertrand amovible, il est souvent possible de faire cette observation à l'aide d'un viseur auxiliaire (pour réglage du contraste de phase) se plaçant à la place de l'oculaire, mais sans alors pouvoir utiliser la sortie photo ou vidéo du microscope.



- a** : image en éclairage orthoscopique (sans lentille de Bertrand) d'un échantillon de cristaux d'acide citrique ($P \perp A$, lignes neutres du cristal bleu ciel à 45° de P , objectif $40\times/0,75$)
- b** : même échantillon et mêmes conditions d'observation que **a** mais avec le diaphragme de champ de l'éclairage Köhler fermé pour juste illuminer une zone à peu près homogène (monocristal d'épaisseur sensiblement constante).
- c** : figure de conoscopie obtenue pour **b** en mettant en service la lentille de Bertrand et en ouvrant au maximum le diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler. (Ligne neutre du cristal à 45° de P). On notera que l'on retrouve au centre du champ la couleur bleu ciel du cristal en observation orthoscopique.
- d** : idem à **c** mais pour une orientation de l'échantillon à 45° de la précédente. (Ligne neutre du cristal $// P$).

Figure 5 : Conoscopie

Complément

Les figures **c** et **d** sont typiques d'un cristal biaxe, propriété qu'il était impossible de déterminer sur les images en éclairage orthoscopique **a** et **b**. (Sur ces figures **c** et **d**, le centre de l'image correspond à un faisceau de lumière normal à la préparation, et le bord à un faisceau incliné de $\arcsin(0,75) \approx 49^\circ$ dans l'air où $0,75$ est l'ouverture numérique de l'objectif $40x$ utilisé.

Remarque

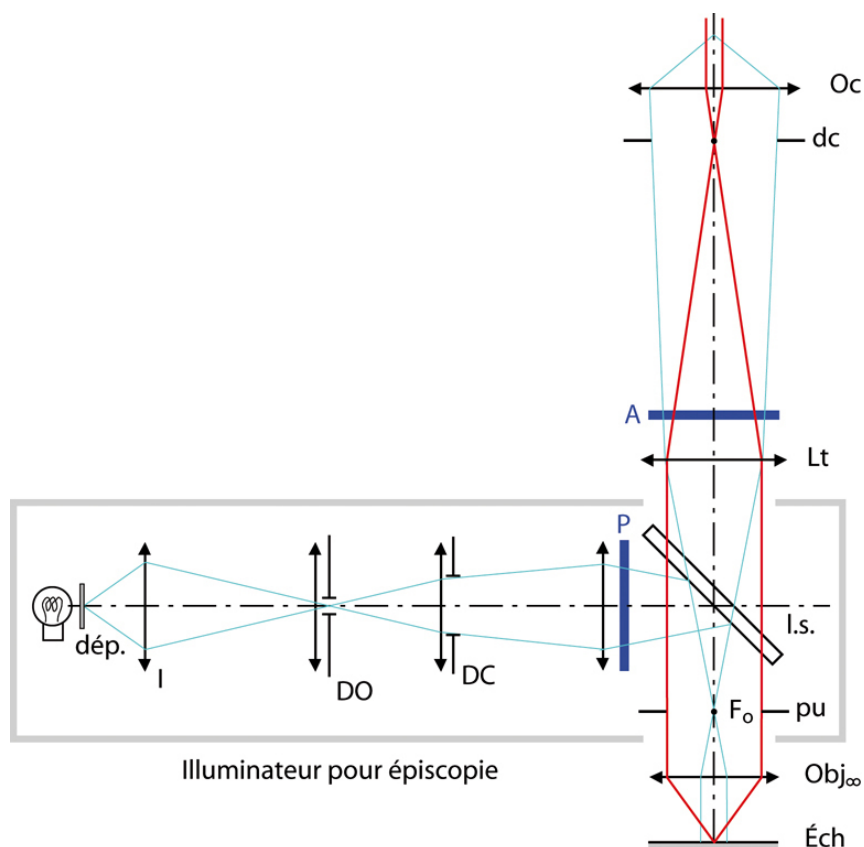
Le ou les axes optiques des cristaux biréfringents pouvant être dans une direction quelconque par rapport à l'axe du microscope, il peut être utile de travailler avec une platine théodolite permettant d'orienter dans une direction quelconque de l'espace la normale à la préparation, qui doit alors être enchâssée entre deux demi-sphères de verre. Voir, par exemple, la référence [[Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur (tome R7)]] ou l'article⁶ ainsi que des cours ou TP de géologie sur l'identification des roches au microscope polarisant pour approfondir ce sujet relativement ardu.

6 - [http://www.zeiss.com/C1256D18002CC306/0/F2BA0A81B5929487C1256D59003351AA/\\$file/46-0014_e.pdf](http://www.zeiss.com/C1256D18002CC306/0/F2BA0A81B5929487C1256D59003351AA/$file/46-0014_e.pdf)

1.2. Observations en réflexion

a) Eclairage orthoscopique en réflexion

Dans le cas de l'éclairage orthoscopique en réflexion, il faut, comme en diascopie, ajouter un polariseur dans l'éclairage **Köhler** et un analyseur dans le corps du microscope (Fig.6). Il est à noter qu'en épiscopie, le polariseur est d'orientation **fixe** pour imposer une polarisation rectiligne strictement TE (ou TM) sur la lame semi-réfléchissante de l'illuminateur par réflexion. Ceci est rendu nécessaire car une lame semi-réfléchissante traitée transforme toute polarisation incidente autre que TE ou TM en polarisation elliptique (*voir cours de polarisation ou d'ellipsométrie*).



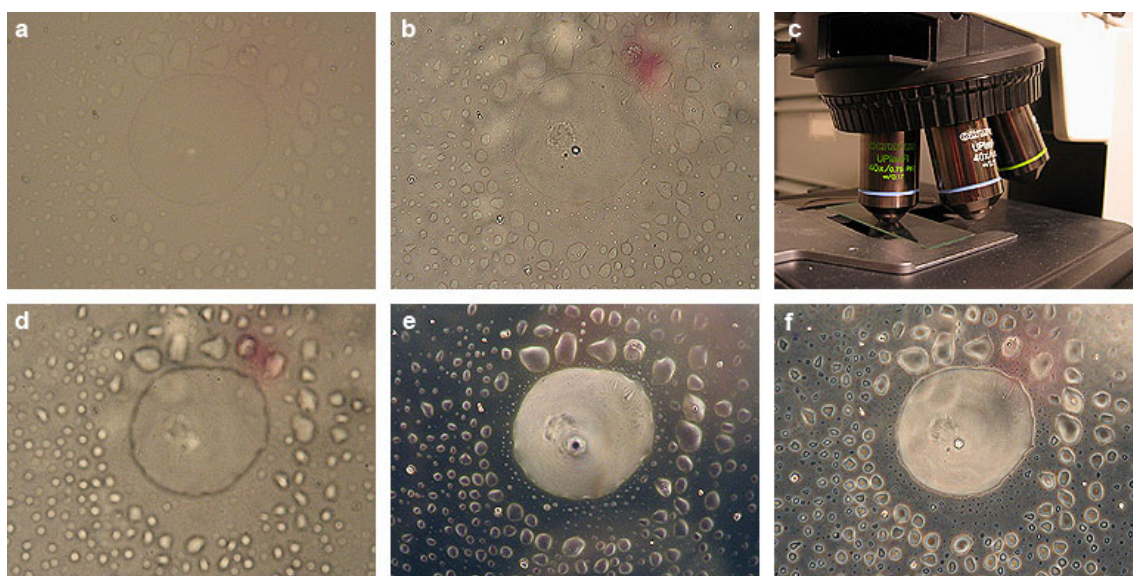
dép. Dépoli	Éch : Échantillon (opaque) observé par réflexion
I : Optique de l'illuminateur	Obj _∞ : Objectif du microscope (corrigé à l'∞)
DC : Diaphragme de Champ	Pu : Pupille de l'objectif (dans le plan focal de Obj _∞)
DO : Diaphragme d'Ouverture	Lt : "lentille" de tube
Oc : Oculaire	Dc : Diaphragme de champ de l'oc.
I.s. : Lame semi-réfléchissante	A : Analyseur (orientable)
P : Polarisateur (de direction fixée, usuellement en TE sur la lame semi-réfléchissante.)	

Figure 6 : Principe du microscope polarisant en réflexion (éclairage orthoscopique)

L'origine physique du contraste de l'échantillon en lumière polarisée épiscopique peut être dû à des phénomènes de diffusion (dépoliarisation) ou aux réflexions sur des matériaux biréfringents ou sur des empilements de couches, biréfringentes pour certaines d'entre-elles (ellipsométrie des empilements de couches minces anisotropes [[Optics of anisotropic layered media: a new 4×4 matrix algebra]]). La partie *étude de cas* de ce grain présente quelques exemples d'observation en éclairage orthoscopique épiscopique.

2. Fond noir et contraste de phase

Les objets de phase, comme les organites d'une cellule vivante ou les défauts de surface d'un matériau poli, forment également une très grande classe d'objets microscopiques quasi-uniformément transparents ou réfléchissants qu'il est important de pouvoir observer avec précision. Plusieurs méthodes existent pour transformer ces variations de phases invisibles à l'œil en variations d'éclairement observables. Le présent paragraphe s'intéresse aux méthodes classiques exploitant le *filtrage des fréquences spatiales*. La figure 7 présente un ensemble de photographies obtenues sur une même préparation par les différentes méthodes expliquées plus en détail par la suite.



Photographies du même objet prises avec un objectif $40\times/0,75$, normal ou dédié au contraste de phase pour f).

- a) image en fond clair en éclairage spatialement incohérent (*pour référence*)
- b) image en fond clair en éclairage spatialement cohérent (*pour référence*)
- c) objectifs $40\times/0,75$ $\infty/0,17$, normal ou dédié pour le contraste de phase [Ph2].
- d) image en fond clair en éclairage cohérent *avec défaut de mise au point*
- e) *image en fond noir*
- f) *image en contraste de phase*

Figure 7 : Exemples d'amélioration de contraste par filtrage des fréquences spatiales

2.1. Rappels sur le filtrage des fréquences spatiales

Seules les grandes lignes des méthodes de filtrage des fréquences spatiales utilisées en microscopie seront rappelées ici. Le lecteur est supposé préalablement connaître le principe du filtrage des fréquences spatiales et le montage classique **de double diffraction**. Pour tout renseignement sur les fondements et les détails de cette méthode nous renvoyons le lecteur au grain " *Formation des images* " et aux références [[Progrès récents en optique cohérente: filtrage des fréquences spatiales, holographie] [Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie]ou [Principles of Optics]].

La théorie, qui relève du filtrage linéaire sur l'amplitude complexe, sera présentée en supposant l'éclairage **monochromatique et spatialement cohérent**. On rappelle toutefois que l'œil ou les détecteurs usuels sont sensibles à l'éclairement, proportionnel au module carré de l'amplitude complexe.

Pour passer au cas des observations usuelles en microscopie, **faites en lumière blanche**, il suffit de réaliser que l'observation globale sera simplement la superposition incohérente (i.e. en éclairage), des différentes images monochromatiques obtenues par le filtrage ; la propriété d'amélioration du contraste des objets est donc naturellement conservée en lumière polychromatique. Quelques commentaires seront faits dans certains cas sur les aspects de cohérence spatiale.

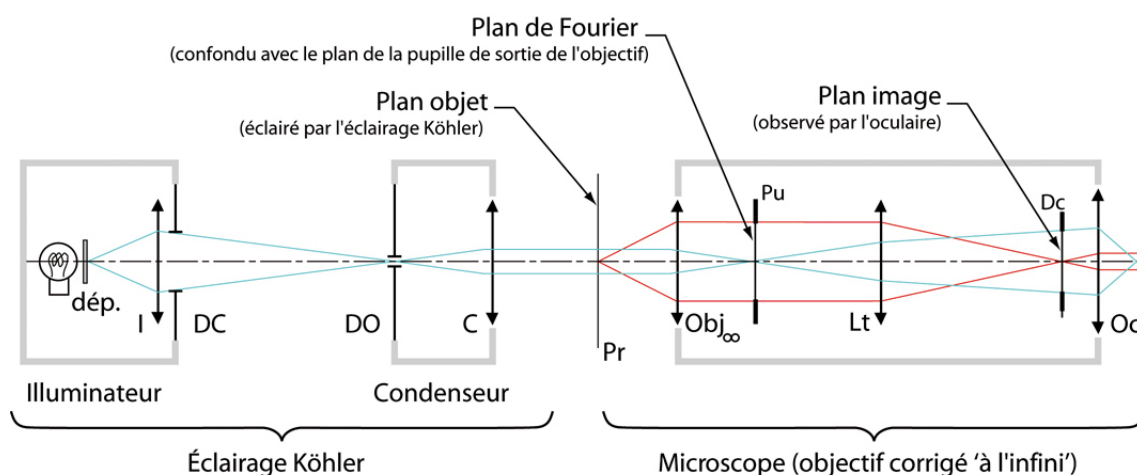
Fondamental

L'opération de double diffraction sera symboliquement représentée par la formulation :

$$\begin{array}{ccccc} \text{objet} & \xrightarrow{\text{TF 1}} & \text{plan de Fourier} & \xrightarrow{\text{TF 2}} & \text{image filtrée} \\ \text{(amplitude complexe)} & & \text{(opération de filtrage)} & & \text{(amplitude complexe)} \end{array}$$

Soit une préparation microscopique formant un objet mince **caractérisé par sa transmittance complexe $t(M)$** où M représente un point du plan de la préparation.

Cet objet est éclairé par une onde plane provenant de l'éclairage **Köhler** en condition d'éclairage spatialement cohérent, c'est à dire avec un diaphragme d'ouverture quasi-pontuel. Voir Fig.8 (Revoir le grain "Principes et utilisations de base du microscope" en ce qui concerne la description de l'éclairage Köhler).



dép. : Dépoli

I : Optique de l'illuminateur

Pr : Préparation (transparente) observée, sur porte échantillon orientable

DC : Diaphragme de Champ (très fermé)

Obj_∞ : Objectif du microscope (corrigé à l'∞)

DO : Diaphragme d'Ouverture

Pu : Pupille de l'objectif

Dc : Diaphragme de champ de l'oc.

C : Optique du condensateur

Lt : "lentille" de tube

Oc : Oculaire

C'est dans le plan de Fourier que seront insérés les éléments réalisant le filtrage des fréquences spatiales.

Figure 8 : Double diffraction et filtrage des fréquences spatiales en microscopie

Dans le *plan de Fourier*, qui correspond en microscopie au plan focal image de l'objectif du microscope (confondu avec le plan de la pupille de sortie de cet objectif), on obtient, à une homothétie et un facteur de phase près, une amplitude complexe proportionnelle à la transformée de Fourier de t :

$$t \xrightarrow{\text{TF 1}} \tilde{t}$$

Dans le cas qui nous intéresse ici, l'objet est usuellement un pur objet de phase, c'est à dire :

$$t(M) = \exp(i \cdot \Phi(M))$$

où Φ est une fonction à valeur réelle représentant le déphasage introduit par l'objet en chaque point de celui-ci. La phase globale de l'onde étant sans importance, on choisit Φ de telle sorte que sa valeur moyenne soit nulle. Si les variations de phase sont faibles ($|\Phi| \ll 1$), l'exponentielle peut être approchée par son développement limité (au premier ordre) et on obtient pour l'amplitude complexe au niveau de l'objet :

$$t(M) \approx 1 + i \cdot \Phi(M) \quad (\phi \text{ réel}, |\Phi| \ll 1)$$

Soit au niveau du plan de Fourier :

$$1 + i \cdot \Phi(M) \xrightarrow{TF 1} \delta + i \cdot \check{\Phi}$$

où δ est la distribution de Dirac, et $\check{\Phi}$ la transformée de Fourier de Φ . Cela signifie en pratique que l'on a un point très lumineux au centre du plan de Fourier (δ) et de la lumière diffractée dans tout le plan ($\check{\Phi}$).

Pour le montage de double diffraction, **sans filtrage** dans le plan de Fourier, on a donc :

$$t(M) \approx 1 + i \cdot \Phi(M) \xrightarrow{TF 1} (\delta + i \cdot \check{\Phi}) \xrightarrow{TF 2} 1 + i \cdot \check{\check{\Phi}} = 1 + i \cdot \check{\Phi}$$

où $\check{\check{\Phi}}(M) = \Phi(-M)$ (Le renversement de l'image induit par la double TF du montage de double diffraction exprime simplement la conjugaison d'optique géométrique avec un grandissement négatif). L'éclairement perçu par l'œil est proportionnel à $|1 + i \cdot \check{\Phi}|^2 = 1 + \check{\Phi}^2$ qui vaut donc 1 pour un calcul au premier ordre, le terme d'ordre 2 étant non significatif ($|\Phi| \ll 1$, $\check{\Phi}^2$ est négligeable devant 1) ; un pur objet de phase est vu comme une plage uniformément éclairée.

En fait ce résultat n'est pas tout à fait exact car l'ouverture numérique finie de l'objectif conduit à une extension limitée de la lumière dans le plan de Fourier (cette limite correspond à la pupille de sortie de l'objectif). L'amplitude complexe de l'image finale est donc l'amplitude complexe de l'objet convolué par la réponse percussive cohérente de l'objectif (l'amplitude complexe de la tache d'Airy si l'objectif est "limité par la diffraction"). L'image peut par conséquent présenter quelques variations du module de l'amplitude complexe (phénomène de Gibbs dû à la coupure brutale des hautes fréquences spatiales, matérialisé par la présence de franges au niveau des changements rapides de phase de l'objet). Cf. Figure 7b.

2.2. Défaut de mise au point en éclairage spatialement cohérent

Un défaut de mise au point du microscope sur la préparation peut être vu comme l'introduction d'une fonction de transfert cohérente différente de la fonction unité dans la pupille de sortie de l'objectif (voir par exemple [[Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie] [Principles of Optics]]). Nous n'allons pas entrer ici dans la formalisation mathématique précise de ce problème dans le cadre de la double diffraction. Il suffit de réaliser qu'hormis les cas des fronts d'onde plan ou sphérique, le module de l'amplitude complexe d'une onde ne reste pas spatialement uniforme lorsque cette dernière se propage en espace libre. Ainsi, hors plan conjugué d'un objet de phase, il n'y a aucune raison que l'éclairement soit spatialement constant, et l'œil peut donc percevoir 'quelque chose' dans l'image (tant en éclairage monochromatique qu'en éclairage polychromatique) lorsque la mise au point du microscope n'est pas bien réalisée. Toutefois, cette image n'est que très indirectement reliée à l'objet de phase de départ et par conséquent cette méthode a une utilité pratique limitée. Elle peut toutefois servir à localiser des objets de phase sur une préparation avant de mettre en œuvre des techniques de contrastes plus performantes. Cf. Figure 7d.

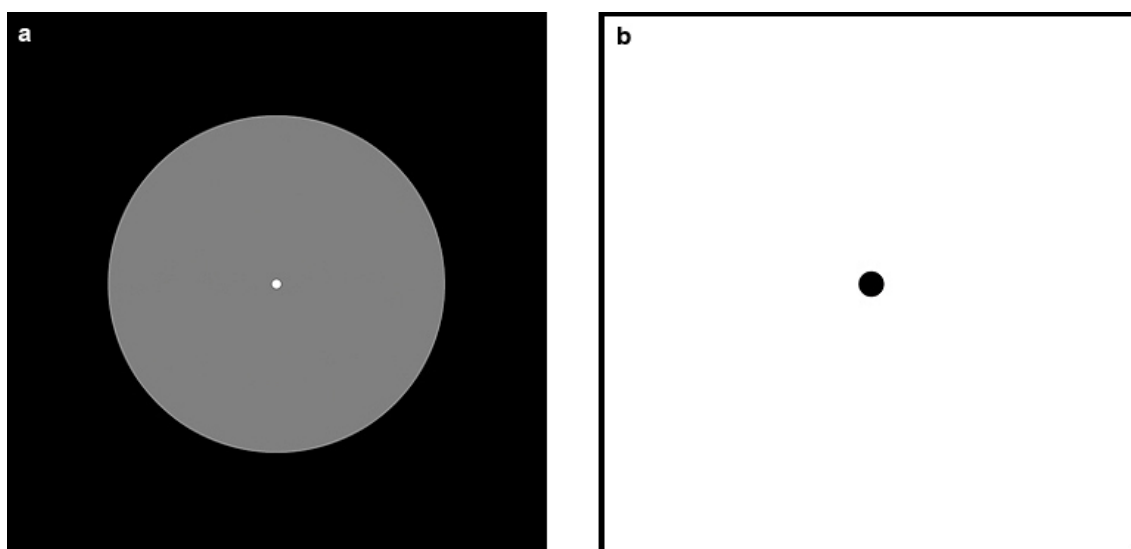
Remarque

En éclairage spatialement incohérent, un défaut de mise au point donne un résultat fort différent puisque le formalisme du filtrage linéaire doit être appliqué aux éclairements. Puisque l'objet de départ est uniforme en éclairage, l'image l'est également quelle que soit l'importance du défaut de mise au point.

2.3. Strioscopie et fond noir

a) Description du filtrage de la strioscopie

Dans le cas de la méthode de strioscopie, le filtrage dans le plan de Fourier consiste à supprimer le point lumineux central (revoir Équ.5 et voir. Fig.9a). Ceci peut être réalisé en pratique en plaçant dans le plan de Fourier une lame de verre à faces planes et parallèles de grande qualité sur une face de laquelle on a déposé en son centre un minuscule disque opaque. Voir Fig.9b. On la positionne de manière à ce que le disque recouvre le point lumineux.



a) Visualisation du plan de Fourier avant filtrage, avec son point lumineux central et son fond gris représentant $\tilde{\Phi}$ limité par la pupille circulaire de l'objectif.

b) Schéma de la lame de filtrage pour la strioscopie, essentiellement transparente avec un dépôt central opaque en forme de petit disque qu'il faut placer dans le plan de Fourier.

Figure 9 : principe du filtrage des fréquences spatiales de la strioscopie en éclairage cohérent

En négligeant la taille finie du disque, le montage par double diffraction donne alors :

$$t \approx 1 + i \cdot \Phi \xrightarrow{TF 1} \theta \times \delta + i \cdot \tilde{\Phi} = i \cdot \tilde{\Phi} \xrightarrow{TF 2} i \cdot \tilde{\tilde{\Phi}} = i \cdot \check{\Phi}$$

L'éclairement, proportionnel au module carré de l'amplitude complexe, a donc pour expression $\check{\Phi}^2$.

Remarque

La démonstration mathématique vraiment correcte de ce résultat nécessite en toute rigueur de partir du développement limité de $\exp(i \cdot \Phi)$ au deuxième ordre. Nous laissons cette vérification en exercice pour le lecteur.

Les déphasages introduits par les éléments présents sur la préparation observée sont donc visualisés sous forme de zones lumineuses sur fond noir.

La dépendance quadratique de l'éclairement avec le déphasage introduit par les différents objets (valable pour les très faibles déphasages $|\Phi| \ll 1$) accompagnée de la suppression des très basses fréquences spatiales due à la taille finie du masque central placé dans le plan de Fourier, conduit à une image dont l'allure peut être assez éloignée de celle de l'objet de phase de départ. Elle permet essentiellement de localiser des objets très petits ou les frontières d'objets plus gros sans usuellement donner de renseignement précis sur les faibles variations de phase qui peuvent être présentes au sein des objets eux-mêmes.

b) Mise en œuvre pratique du fond noir en diascope

Le formalisme précédemment exposé s'applique pour un éclairage spatialement cohérent. En microscopie, à l'inverse des montages sur banc où un laser peut éventuellement être utilisé, la source de lumière n'est usuellement pas intrinsèquement spatialement cohérente puisqu'il s'agit simplement de l'éclairage Köhler standard du microscope avec le diaphragme d'ouverture très fermé. La luminosité de l'image est dans ce cas très basse puisque seule une très faible partie de la puissance de la source contribue effectivement à l'éclairage de la préparation ; de surcroît, la puissance utile est en grande partie absorbée par le masque central dans le plan de Fourier. Il est donc nécessaire, au-delà de l'utilisation d'un éclairage puissant (lampe halogène de $\sim 100\text{ W}$, soit typiquement $\sim 1500\text{ lumen}$), de disposer d'une astuce : utiliser une source spatialement partiellement cohérente et non pas purement cohérente pour augmenter le flux utile. D'un point de vue théorique, chaque point d'une source étendue incohérente est cohérent avec lui même, et le formalisme de Fourier peut être appliqué aux amplitudes complexes de l'onde engendrée par ce point source particulier ; il suffit ensuite de sommer de manière incohérente, c'est à dire en éclairage, les images formées par tous les points sources pour reconstituer l'image globale réellement observée. La strioscopie est donc en pratique mise en œuvre sur les microscopes du commerce, sous le nom de '**fond noir**', en utilisant une source annulaire et la pupille de l'objectif pour réaliser la coupure de la fréquence spatiale nulle (Fig.10 et Fig.11).

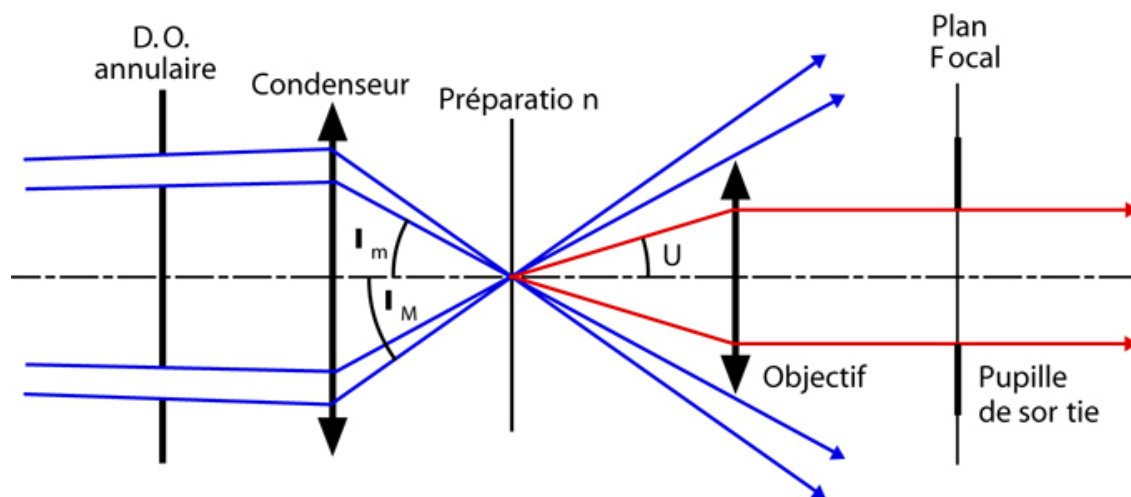


Figure 10 : Principe de l'éclairage fond noir en diascope

L'éclairage de la préparation à observer est réalisé uniquement par des rayons très inclinés par rapport à l'axe du système optique compris entre deux angles limites α_m et α_M ($0 < \alpha_m < \alpha_M$). Dans l'espace des directions ces rayons forment donc une sorte de nappe conique. Ceci est réalisé en introduisant une obturation centrale dans le plan du diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler. L'angle α_m est choisi de manière à dépasser l'angle maximal d'acceptance de l'objectif de microscope utilisé, c'est à dire que $n \cdot \sin(\alpha_m) > NA_{obj} = n \cdot \sin(U)$ où n est l'indice de réfraction du milieu objet de l'objectif (voir la figure 10). Si la préparation observée est uniforme, aucune lumière ne sort de l'objectif : le fond est donc noir. Par contre, s'il y a de petits objets, ceux-ci vont diffracter la lumière dans toutes les directions et ils seront donc vus dans l'image finale sous forme de traces lumineuses sur un fond très sombre. Cette méthode fonctionne de ce point de vue tant pour des objets de phase que pour des objets d'amplitude ou des objets mixtes.

La figure 11 précise de manière schématique le filtrage des fréquences spatiales passe-haut (en toute rigueur passe-bande si on prend en compte la taille finie de la pupille) réalisé par cette méthode. Comme déjà signalé pour la strioscopie pure, ce type de filtrage peut notablement distordre l'apparence de l'objet dans certaines situations. Ce mode de visualisation est surtout utilisé pour mettre en évidence la présence d'objets ou de détails de très petites tailles (éventuellement en dessous de la limite de résolution de l'objectif en utilisation fond clair standard). Cf. figure 7e

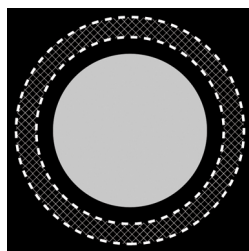


Figure 11 : Filtrage des fréquences spatiales en éclairage 'fond noir'

Complément

Visualisation du plan de Fourier en éclairage fond noir : L'image du diaphragme d'ouverture annulaire de l'éclairage Köhler, matérialisée par les hachures et pointillés blancs, est, par construction, **à l'extérieur** de la pupille de sortie de l'objectif du microscope, représentée par le disque gris clair, et est donc cachée. La lumière visible dans la pupille provient de la lumière diffractée par la préparation ; elle peut être vue comme la superposition incohérente des Φ centrés sur chaque point de la source annulaire et limités par la pupille circulaire de l'objectif qui exclut toujours la fréquence spatiale nulle et les basses fréquences voisines. L'image globale observée est donc la superposition incohérente d'un ensemble d'images en amplitude complexe ayant subies un filtrage passe-haut (passe bande en toute rigueur).

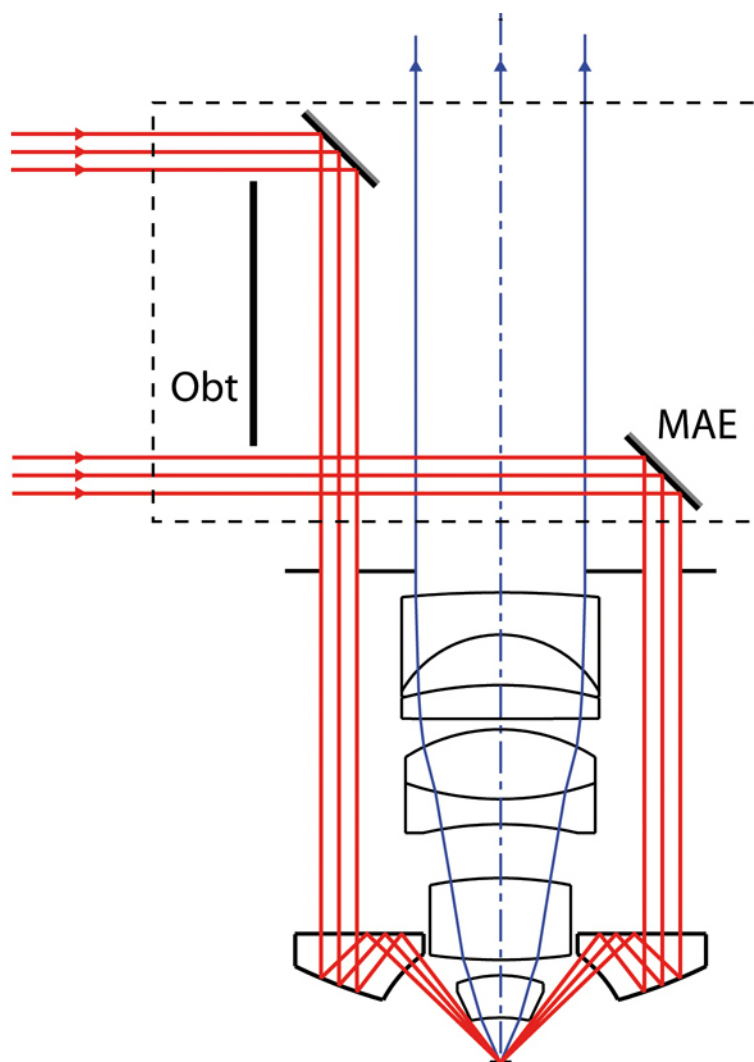
Attention

Pour les objectifs à immersion, dont les ouvertures numériques dépassent couramment 1,25, le condenseur d'éclairage fond noir doit être particulièrement performant puisque l'éclairage doit être compris entre des ouvertures numériques de 1,3 et 1,4. De telles caractéristiques imposent en particulier que le condenseur soit également à immersion.

c) Fond noir en épiscopie

Il est également possible de travailler en fond noir sur les objets opaques observés par réflexion. Ce mode de fonctionnement est même très souvent utilisé en contrôle métallurgique ou pour l'observation des circuits intégrés microélectroniques. L'éclairage à travers l'objectif complique toutefois sérieusement la méthode. Un objectif métallographique pour fond noir est en fait constitué d'un objectif métallographique standard entouré d'une optique annulaire permettant l'éclairage oblique. La lame semi-réfléchissante du bloc illuminateur est remplacée par un miroir troué de forme annulaire elliptique. La figure 12 présente le schéma de principe d'un tel objectif surmonté du bloc miroir d'injection de la lumière de l'éclairage Köhler épiscopique.

De tels objectifs, de diamètre très supérieur aux objectifs standard, sont commercialisés par les grands fabricants pour leurs microscopes métallographiques de moyen ou haut de gamme. Ils nécessitent un 'bloc miroir d'éclairage' spécifique ainsi qu'une tourelle revolver spéciale avec des trous filetés de diamètre supérieur à la valeur usuelle pour permettre le passage de l'éclairage annulaire.



Sur ce schéma, l'objectif a une ouverture numérique de 0,4 [20×/0,40 ∞/0] et le cône d'éclairage a une ouverture numérique comprise entre ~0,6 et ~0,7.

MAE : Miroir plan à 45° de forme annulaire elliptique réfléchissant la lumière provenant de l'éclairage Köhler épiscopique

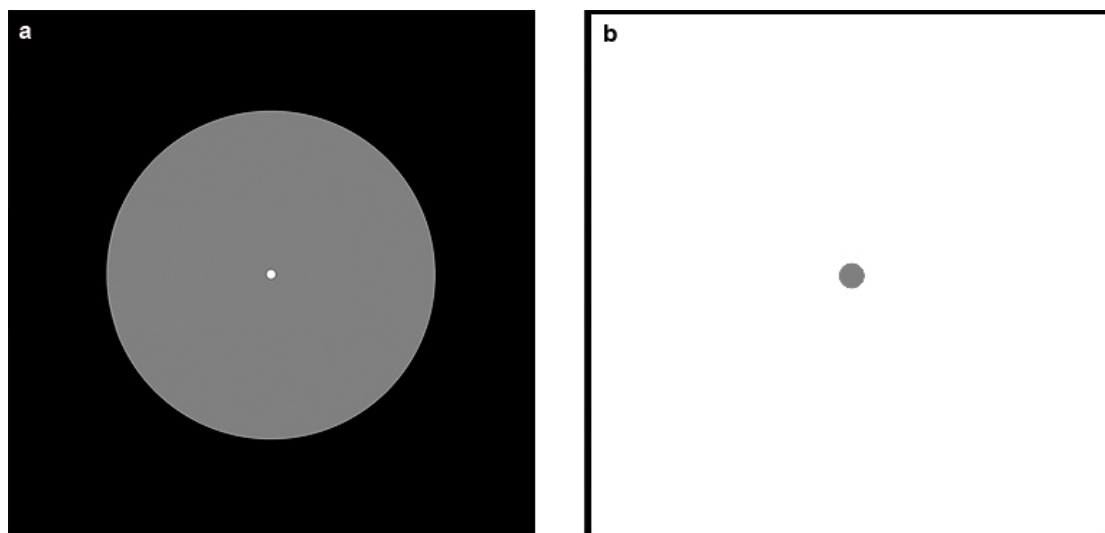
Obt : Obturation (pour limiter la lumière parasite)

Figure 12 : Schéma de principe d'un objectif pour fond noir épiscopique avec son optique annulaire d'éclairage et son 'bloc miroir d'éclairage'

2.4. Contraste de phase

a) Description du filtrage

Dans le cas du contraste de phase, le filtrage dans le plan de Fourier consiste à déphaser de $\pm\pi/2$ radians et à atténuer le point lumineux central. Voir Fig.13a. Ceci peut être réalisé en pratique en plaçant dans le plan de Fourier une lame de verre à faces planes et parallèles de grande qualité sur une face de laquelle on a déposé en son centre un minuscule disque d'une épaisseur appropriée d'un matériau diélectrique absorbant (souvent de l'aluminium). Voir Fig.13b. Cette lame est appelée 'lame de phase'. On la positionne de manière à ce que le disque recouvre le point lumineux.



- a) Visualisation du plan de Fourier avant filtrage, avec son point lumineux central et son fond gris représentant $\check{\Phi}$ limité par la pupille circulaire de l'objectif.
- b) Schéma de la *lame de phase*, essentiellement transparente, avec son dépôt central atténuant et déphasant en forme de petit disque qu'il faut placer dans le plan de Fourier pour réaliser le filtrage du contraste de phase.

Figure 13 : principe du filtrage des fréquences spatiales du contraste de phase en éclairage cohérent

En négligeant la taille finie du disque, le montage par double diffraction donne alors, si γ représente le coefficient d'atténuation (en amplitude) du point lumineux central ($\gamma \in]0,1]$) :

$$t \approx 1 + i \cdot \check{\Phi} \xrightarrow{TF 1} \pm i \cdot \gamma \cdot \delta + i \cdot \check{\Phi} \xrightarrow{TF 2} \pm i \cdot \gamma + i \cdot \check{\Phi} = i(\pm\gamma + \check{\Phi})$$

Le facteur $\pm i = e^{\pm i\pi/2}$ devant le terme $\gamma \cdot \delta$ traduit le déphasage de $\pm\pi/2$ introduit par la lame de phase.

L'éclairement, proportionnel au module carré de l'amplitude complexe, a donc pour expression

$$(\pm\gamma + \check{\Phi})^2 \approx \gamma^2 \pm 2\gamma\check{\Phi} \approx \gamma^2 \left(1 \pm \frac{2\check{\Phi}}{\gamma}\right)$$

en négligeant le terme non significatif du deuxième ordre $\check{\Phi}^2$ devant les autres termes dans ce calcul au premier ordre.

Fondamental

Les variations de phase de l'objet sont alors perçues comme des variations de luminosité sur un fond plus ou moins clair. (Cf. Figure 7f).

Les variations d'éclairement de l'image sont **proportionnelles** aux variations de phase de l'objet.

Remarque

Suivant que le point lumineux central dans le plan de Fourier verra sa phase retardée ou respectivement avancée (i.e. déphasage de respectivement $+\pi/2$ (i.e. $\times +i$) et $-\pi/2$ (i.e. $\times -i$) en convention $e^{-i\omega t}$), un retard de phase dans le front d'onde (chemin optique parcouru dans l'objet plus grand; $\check{\Phi}$ positif en convention $e^{-i\omega t}$) sera perçu comme **plus** ou respectivement **moins** lumineux que le fond, et vice versa pour une avance de phase. On parle dans le premier cas (*détail plus lumineux pour un retard de phase*) de contraste de phase *négatif* et dans le second de contraste de phase positif (cf. [[Le contraste de phase en optique et en microscopie]]). Les anglo-saxons parlent eux respectivement de contraste de phase "brillant"

(*bright phase contrast*) ou "sombre" (*dark phase contrast*) en se référant à la manière dont apparaît un excès de chemin optique dans l'objet (cf. [[Principles of Optics]]).

On peut noter que **sans** atténuation, c'est à dire pour $\gamma = 1$, l'éclairement observé par l'œil ou une caméra serait proportionnel à $1 \pm 2\tilde{\Phi}$ et serait donc de très faible contraste puisque $|\Phi| \ll 1$.

Le contraste C de l'image obtenue, rapport des variations caractéristiques de luminosité sur la valeur moyenne de cette dernière, s'exprime donc par :

$$C = \frac{\Delta\Phi}{\gamma}$$

où $\Delta\Phi$ représente les variations typiques de phase au sein de l'objet.

Le contraste est d'autant meilleur que γ est petit, c'est à dire que l'atténuation est importante. (Pour γ strictement nul, les résultats précédents ne sont pas applicables ; on retombe en fait sur le cas de la striescopie traité au paragraphe précédent).

En pratique, la taille finie du disque atténuant et déphasant altère (atténue) en fait également $\tilde{\Phi}(P)$ pour les points P très proches du centre, qui correspondent aux très basses fréquences spatiales. La méthode du contraste de phase n'est donc pas adaptée pour mettre en évidence des variations spatiales de phase lentes dont la longueur typique de variation est, par exemple, de l'ordre de la moitié ou du quart du champ observé. Il est également à noter que la taille finie de la pupille de sortie de l'objectif du microscope, non décrite dans le formalisme simple précédemment décrit, implique également une coupure haute brutale de la fonction de transfert des fréquences spatiales qui induit un phénomène de Gibbs donnant des oscillations artificielles (franges) aux voisinages des variations rapides de phase de l'objet.

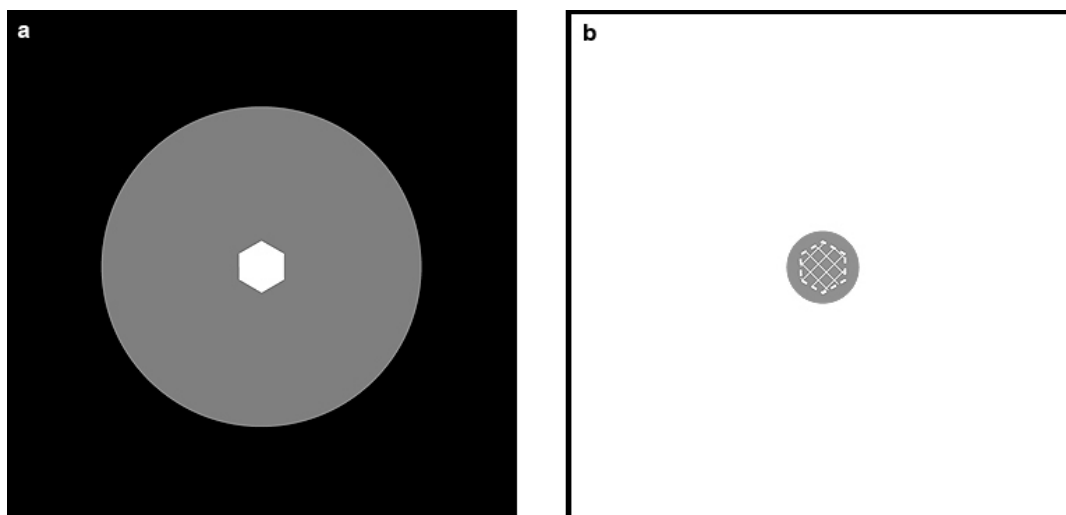
Remarque

D'un point de vue expérimental, il est difficile de réaliser un déphasage précis de $\pm\pi/2$, a fortiori simultanément pour toutes les longueurs d'onde du visible dans le cas d'un éclairage standard en lumière blanche. En fait, la transformation des variations de phase en variation d'éclairement fonctionne toujours, mais un peu moins efficacement, si on s'éloigne de la valeur idéale du déphasage. Par exemple, une erreur de $\pm\pi/4$ par rapport à la valeur visée de $\pm\pi/2$ ne produit qu'une chute de $\sim 30\%$ du contraste. De surcroît, si l'objet observé introduit simultanément des petites variations de phase et de transmission, cas relativement courant pour des objets biologiques, le déphasage optimal n'est plus d'exactly $\pm\pi/2$ mais dépend de l'objet (cf. [[Le contraste de phase en optique et en microscopie] et [Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel.]]). Il s'avère en pratique que la valeur précise du déphasage introduit n'est pas cruciale pour des observations qualitatives des détails de l'image. A contrario, le montage du contraste de phase n'est jamais utilisé pour faire des *mesures* de déphasage, mais seulement pour mettre en évidence l'existence de variations spatiales de phase dans un objet bidimensionnel.

b) Mise en œuvre pratique

Comme pour la striescopie traitée au paragraphe précédent, le formalisme précédemment exposé s'applique pour un éclairage spatialement cohérent, c'est à dire en microscopie standard pour un éclairage **Köhler** dont le diaphragme d'ouverture est a priori très fermé, et la luminosité de l'image est dans ce cas très basse puisque le flux utile pour éclairer la préparation est faible et qu'une grande partie de celui-ci est de surcroît absorbée par la lame de phase. Il est donc nécessaire, comme pour le fond noir, d'utiliser en pratique un éclairage puissant et une source spatialement partiellement cohérente.

Une première possibilité envisageable est alors de travailler avec un diaphragme d'ouverture plus ouvert et filtrer sur une zone plus large (couvrant l'image du D.O. dans le plan pupillaire de l'objectif – Voir Fig.14).

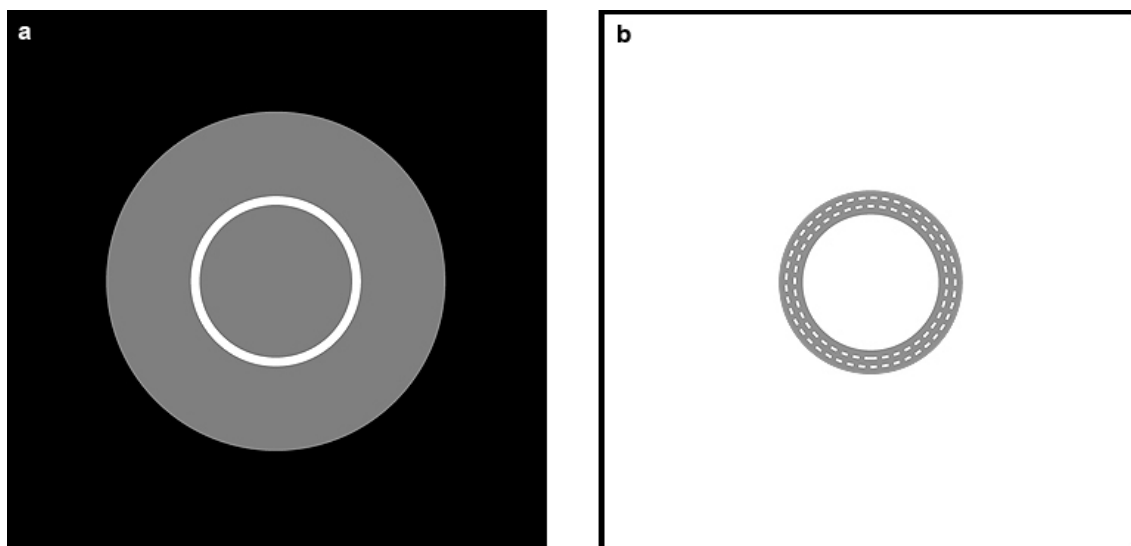


- a) Visualisation du plan de la pupille de sortie de l'objectif avant filtrage. On remarque au centre l'image du diaphragme d'ouverture (usuellement polygonale) de l'éclairage Köhler qui se forme, par construction, dans ce plan (revoir Fig.8).
- b) Schéma de la *lame de phase* avec son dépôt central atténuant et déphasant dont le disque doit être de diamètre suffisant pour entièrement couvrir l'image du diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler, tous les points de celle-ci devant être atténués et déphasés.

Figure 14 : Filtrage des fréquences spatiales du contraste de phase en éclairage partiellement cohérent dû à un diaphragme d'ouverture moyennement ouvert.

Chaque point lumineux de l'image du diaphragme d'ouverture Fig.14a joue le rôle du pic δ de Dirac de la formule 8 en étant le centre d'un espace des fréquences spatiales pour cette onde cohérente particulière. Le fond gris représente de manière schématique la superposition incohérente de tous les $\tilde{\Phi}$ centrés sur chaque point de l'image du diaphragme d'ouverture et limités par la pupille circulaire de l'objectif. On voit alors Fig.14b que, en moyenne, le filtrage s'étend loin dans les basses et moyennes fréquences spatiales autour de chacun des pics δ de Dirac par suite du diamètre important requis pour le dépôt central de la lame de phase. Ceci conduit, si l'on veut remonter la luminosité avec un diaphragme d'ouverture suffisamment ouvert, à **une altération inacceptable des basses et des moyennes fréquences spatiales** de l'image globale formée par superposition incohérente des différentes images d'amplitude complexe filtrées et cette méthode n'est donc pas adaptée en pratique.

En fait, la solution la plus couramment adoptée consiste à utiliser un diaphragme d'ouverture **annulaire** (en substituant au niveau de l'éclairage **Köhler** le diaphragme à iris réglable pour une ouverture de cette forme) et de filtrer dans le plan de Fourier avec un filtre ayant également une forme annulaire, généralement appelé *anneau de phase*. Voir Fig.15. L'épaisseur de ces deux couronnes peut être faible pour préserver les basses fréquences spatiales alors même que la surface du diaphragme d'ouverture annulaire peut être importante afin de conférer une bonne luminosité à l'image. De surcroît cette configuration conserve la symétrie de révolution du système ce qui permet à la méthode de ne pas dépendre de l'orientation de l'objet.



- a) Visualisation du plan de Fourier avant filtrage, avec l'image du diaphragme d'ouverture **annulaire** de l'éclairage Köhler et le fond gris représentant la superposition incohérente des $\tilde{\Phi}$ centrés sur chaque point de la source annulaire et limités par la pupille circulaire de l'objectif.
- b) Schéma de la *lame de phase* avec son dépôt central atténuant et déphasant de forme également **annulaire** (dit 'anneau de phase'), de diamètre et épaisseur adaptés pour juste recouvrir l'image du diaphragme d'ouverture visible figure a).

Figure 15 : Filtrage des fréquences spatiales du contraste de phase en éclairage partiellement cohérent dû à un diaphragme d'ouverture annulaire (cas le plus classique)

La lame de phase doit être positionnée dans le plan de Fourier qui, comme il a déjà été signalé, coïncide avec le plan de la pupille de sortie de l'objectif (revoir la Fig.8). Cependant, ce plan est, sur les objectifs usuels, le plus souvent mécaniquement inaccessible (il est, par exemple, au niveau du filetage de la monture mécanique de l'objectif). Deux solutions sont apportées à ce problème par les constructeurs de microscope. La première, de très loin la plus courante, consiste à intégrer la lame de phase dans l'objectif dès sa construction, créant ainsi une gamme spéciale d'objectifs dédiés au contraste de phase. Cette méthode ne peut cependant pas être utilisée en épiscopie où l'éclairage, réalisé en passant au travers l'objectif, serait altéré par la lame de phase. (Revoir l'éclairage **Köhler** en épiscopie du grain «*Principes et utilisations de base du microscope*⁸», où la Fig.6 en faisant abstraction du polariseur et de l'analyseur). La seconde, disponible sur certains microscopes de très haut de gamme (microscopes dit 'de recherche') consiste à réaliser, par une optique supplémentaire appelée *véhicule pupillaire*, une image du plan de Fourier dans un plan suffisamment éloigné des montures afin qu'il soit possible d'insérer la lame de phase, généralement amovible dans ce cas, sans difficulté particulière. Cette deuxième méthode, qui peut être mis en œuvre en épiscopie en plaçant simplement le véhicule pupillaire en aval de la lame semi-réfléchissante de l'éclairage, présente l'avantage de permettre des observations en contraste de phase avec tous les objectifs disponibles et non pas avec seulement quelques objectifs dédiés. La réalisation d'un bon véhicule pupillaire qui n'altère pas la qualité des images données par le microscope est toutefois très délicate et donc fort coûteuse.

Conseil

Notez par ailleurs que les diamètres et les largeurs de l'anneau de l'éclairage annulaire et de l'anneau de phase doivent être correctement adaptées les uns aux autres pour permettre un fonctionnement correct du système. Cette adéquation n'est évidemment valable que pour un couple *condenseur/objectif* donné.

8 - http://prn1.univ-lemans.fr/prn1/siteheberge/optique/M11G1_JSurrelHSauer/co/M11G1_web.html

D'un point de vue pratique, l'observation en contraste de phase sur un microscope standard nécessite de mettre en place l'objectif à lame de phase intégrée via la tourelle porte objectif (ou, sur un microscope de recherche, de mettre en place l'objectif d'intérêt et de mettre en service la lame de phase avec la manette appropriée) puis d'insérer dans le condenseur du bloc d'éclairage Köhler, par le mécanisme prévu à cet effet, le diaphragme d'ouverture annulaire adapté au condenseur et à l'objectif utilisés. Le plus souvent, un dispositif de centrage de ce diaphragme est à la disposition de l'utilisateur. Pour réaliser ce centrage, l'utilisateur doit observer le plan de Fourier. Cela peut être fait en insérant la lentille de Bertrand dans le chemin optique si le statif du microscope en dispose (revoir la figure 4) ou en remplaçant l'oculaire par un viseur spécial fourni par le constructeur. La figure 16 présente quelques photos d'observations réelles du plan de Fourier avec un tel viseur spécial.



- a) Image du diaphragme d'ouverture annulaire de l'éclairage Köhler avec un objectif normal sans lame de phase. (Correspond à la figure 15a. La pupille du microscope, dont le contour est ici à l'extérieur de la photographie, n'est pas perceptible car la lumière diffractée par l'objet observé est concentrée dans les basses fréquences spatiales et forme juste le halo entourant l'anneau. Les trois 'coupures' à 120° visibles dans l'anneau sont dues à des impératifs techniques de réalisation du diaphragme annulaire).
- b) Image du diaphragme d'ouverture annulaire de l'éclairage Köhler superposée à l'anneau de phase de la lame de phase (objectif dédié au contraste de phase) avec un mauvais centrage. (On notera bien l'atténuation introduite par l'anneau de la lame de phase).
- c) Idem à b) mais avec un bon centrage. L'image directe du diaphragme d'ouverture annulaire est complètement occultée par l'anneau de phase.

Figure 16 : Photographies du plan de Fourier (contraste de phase)

3. Techniques interférométriques

3.1. Généralités

L'interférométrie est une méthode classique en optique pour révéler ou mesurer la phase d'une onde lumineuse. La plupart des schémas d'interféromètres-imageurs 'macroscopiques', qu'ils soient basés sur *l'interférométrie normale* (comparaison d'un front d'onde d'intérêt avec un front d'onde de référence) ou sur *l'interférométrie différentielle* (comparaison d'un front d'onde d'intérêt avec ce même front d'onde translaté et éventuellement basculé), peuvent être transposés à la microscopie.

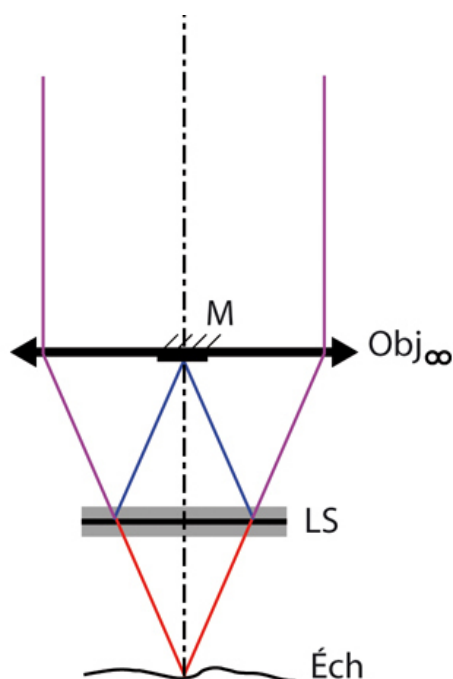
Complément

C'est en particulier le cas des interféromètres de **Mach-Zehnder**, **Michelson**, **Fabry-Pérot**, ... Les microscopistes appellent souvent ces interféromètres du nom du physicien qui l'a adapté à la microscopie. Ainsi on parle de dispositifs '**Michelson-Linnik**' (Michelson), '**Mirau**' (Michelson), '**Watson**' (Michelson), '**Tolansky**' (Fabry-Pérot),... Voir la référence [[Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur (tome R7)] pour les détails de ces adaptations.

La plupart des transpositions d'interféromètre en microscopie nécessite toutefois du matériel très spécifique, de diffusion très restreinte. Seuls deux dispositifs, facilement adaptables à des microscopes commerciaux ordinaires, à savoir l'objectif de Mirau et le contraste interférentiel différentiel Nomarski, sont actuellement couramment disponibles et utilisés, et nous nous limiterons à la description de ceux-ci.

3.2. L'objectif de Mirau

Il s'agit d'une adaptation de l'interféromètre de Michelson à la microscopie. Son schéma de principe est donné figure 17.

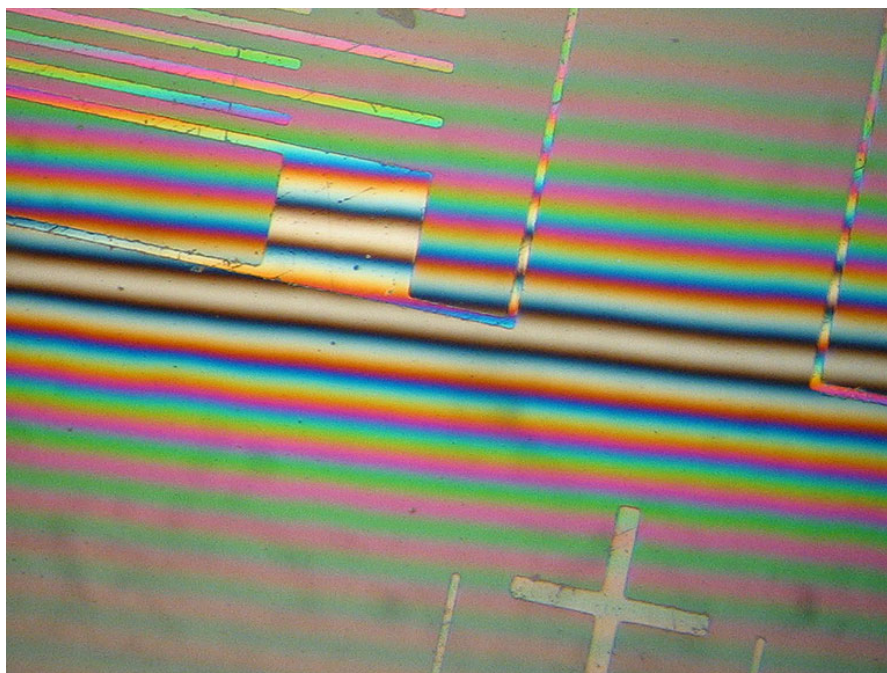


- Obj_∞** : Objectif de microscope (corrigé à l'infini) à grande frontale
- LS** : Lamme semi-réfléchissante 50% avec compensatrice symétrique
- M** : Miroir plan de référence
- Éch** : Échantillon à observer

La présence du miroir induit une obturation centrale dans le système optique.

Figure 17 : Schéma de principe de l'objectif de Mirau

Un tel objectif s'utilise **en épiscopie**. La lumière injectée par l'éclairage **Köhler** est focalisée par l'objectif (voir Fig.17) puis séparée en deux ondes par la lame semi-réfléchissante. Les deux faisceaux se réfléchissent, sur l'échantillon pour l'un, sur le miroir de référence pour l'autre, puis sont recombinés par la lame semi-réfléchissante. Cela conduit à observer des franges d'égale épaisseur superposées à l'image de l'objet (voir Fig.18). Pour des raisons de coût en lien avec la grande frontale requise pour placer mécaniquement l'interféromètre et également des raisons plus fondamentales évoquées ultérieurement, les objectifs de Mirau ont usuellement des ouvertures numériques relativement faibles ($NA < \sim 0.30$). Ceci conduit à une latitude axiale de mise au point (de l'ordre de λ/NA^2) très supérieure au déplacement nécessaire pour modifier sensiblement les franges (un déplacement axial de $\lambda/2$ change le déphasage de 2π radians, et donc l'ordre d'interférence de ± 1). Le mouvement fin de mise au point du microscope déplace donc fortement les franges dans le champ alors même que la netteté de l'objet évolue peu.

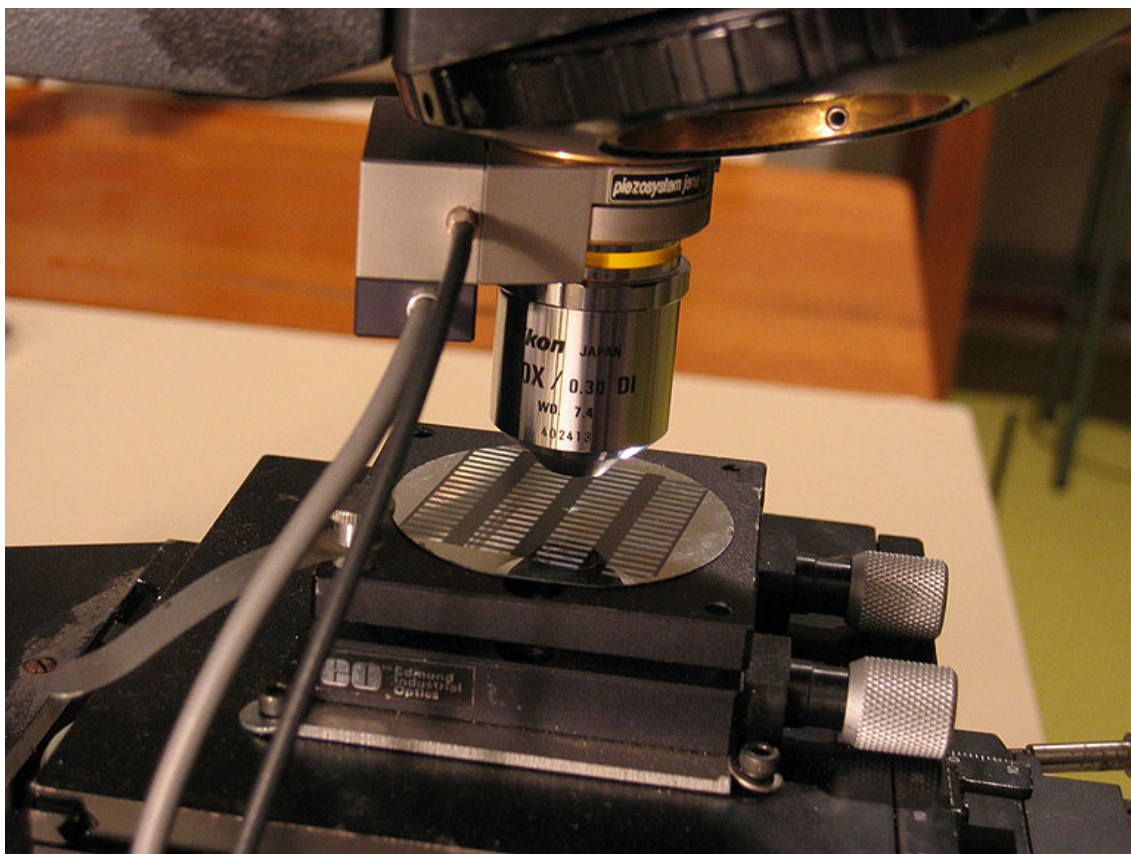


Microphotographie de pistes (épaisses, $\sim 0,5\mu\text{m}$) d'aluminium sur un substrat plan de silicium.
Objectif de Mirau $10\times/0,30\ \infty/0$.

Figure 18 : Image donnée en lumière blanche par un objectif de Mirau

Les franges rectilignes traduisent essentiellement une très légère inclinaison entre le substrat et le miroir de référence de l'objectif de Mirau. Le relief des motifs est caractérisé par le déplacement des franges par rapport à celles présentes sur le substrat.

Ces franges matérialisent des courbes d'iso-déphasage plus ou moins caractéristiques du relief de l'échantillon. Un tel interférogramme peut être analysé par toutes les techniques classiques utilisées en contrôle interférométrique d'objet macroscopiques. En particulier, il est possible et même relativement classique d'utiliser la technique du *glissement de phase* ('*phase-shift*') [[Optical Shop Testing]] en plaçant l'objectif de Mirau sur une cale piézoélectrique, afin d'induire un mouvement axial contrôlé du bloc objectif + lame semi-réfléchissante + miroir de référence par rapport à la surface de l'échantillon à étudier (voir Fig.19), ce qui donne accès à une cartographie du relief de haute précision (de l'ordre de $\lambda/20$) ayant par ailleurs une résolution latérale correspondant au pouvoir de résolution d'un objectif de microscope.



Objectif de Mirau et cale piézoélectrique du commerce montés sur une tourelle standard d'un microscope métallographique. L'objectif est un $10\times/0,30 \infty/0$ ayant une distance de travail entre la lame semi-réfléchissante et l'échantillon de 7,4mm.

Figure 19 : Photographie d'un objectif de Mirau commercial et de la cale piézoélectrique permettant de réaliser le 'phase-shift'

On remarquera également la platine porte échantillon spéciale avec réglage micrométrique de basculement 2 axes qui permet de régler finement le parallélisme de l'échantillon et du miroir de référence de l'objectif de Mirau (contrôle du nombre de franges visibles dans le champ).

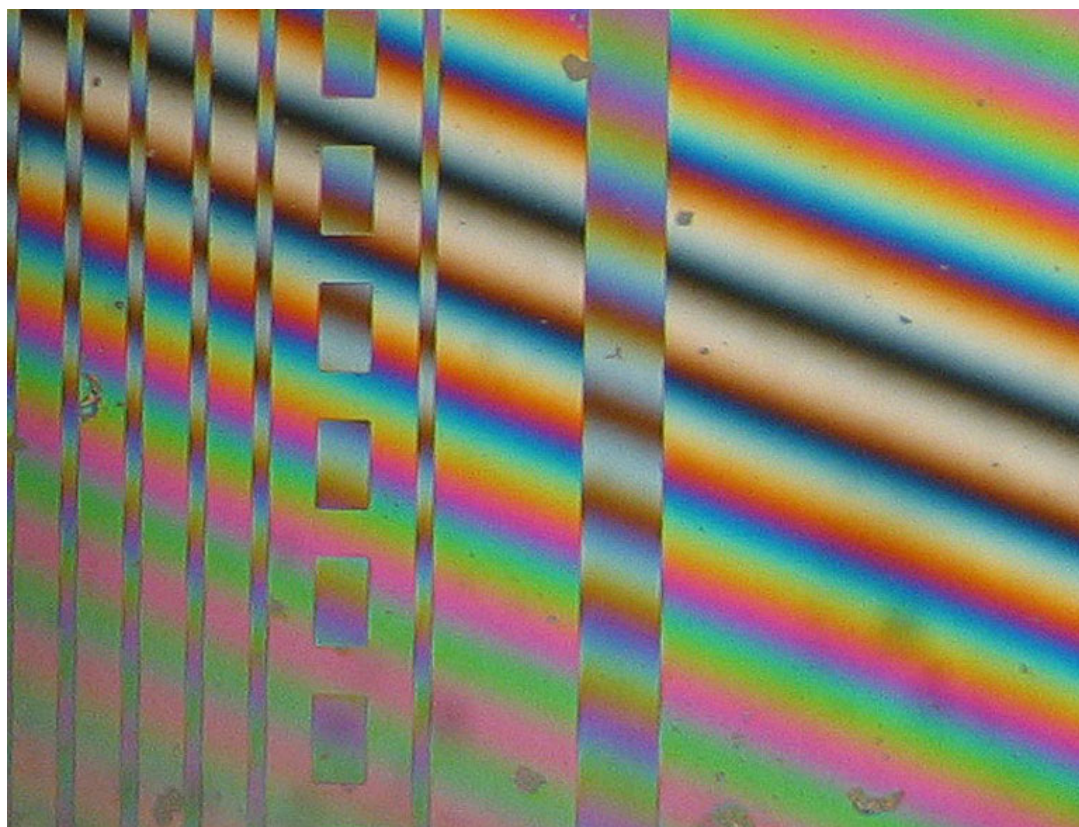
Attention

Les franges données par l'objectif de Mirau sont fondamentalement reliées à la phase de la lumière après réflexion sur l'échantillon (comparativement à la phase de la lumière réfléchi sur le miroir de référence). Ceci peut soulever quelques problèmes pratiques et des difficultés d'interprétation :

- **Tout d'abord, à une longueur d'onde λ donnée, le déphasage entre les deux ondes dans la lame d'air d'épaisseur e de l'interféromètre de Michelson, n'est bien défini que pour un angle d'incidence θ donné [expression $\Delta\phi = (2 \cdot e \cdot \cos(\theta)) \times (2\pi/\lambda)$ bien connue]. L'ouverture numérique de l'objectif doit donc être limitée pour éviter une chute du contraste des franges lorsque l'on s'éloigne de la frange d'ordre 0 et donner un lien clair entre le déphasage et l'épaisseur locale de la lame d'air à caractériser.**
- **Si l'on travaille avec un éclairage monochromatique, les franges ont un contraste indépendant de l'ordre d'interférence. Dans le cas d'objet présentant des marches abruptes ayant des dénivelés plus grand que $\lambda/2$, il n'est plus possible de déterminer la hauteur des marches par suite de la détermination modulo 2π de la phase. On peut lever cette indétermination en travaillant en lumière blanche (revoir la Fig.18 où l'on constate, par exemple, un**

déplacement de deux interfranges sur le motif rectangulaire en haut à gauche de la photographie). Il est en fait possible d'étendre la technique du 'phase-shift' à la lumière à faible cohérence temporelle pour combiner précision nanométrique et dynamique élevée de mesure [[Determination of fringe order in white-light interference microscopy]].

- Dans le cas d'un échantillon inhomogène, par exemple constitué d'un substrat de silicium sur lequel sont déposés des motifs localisés de diélectrique transparent comme de la résine ou encore des empilements localisés de différents matériaux (oxyde, nitrure, résine, ...), le déphasage de l'onde à la réflexion en différents points de l'échantillon dépend de la structure locale de l'échantillon (indices de réfraction, épaisseurs), de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence et de la polarisation (*problème d'électromagnétisme, voir par exemple* [[Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées]]). La différence de phase entre l'onde réfléchie entre deux empilements voisins n'est alors pas directement reliée à la différence de hauteur des empilements. De surcroît, la dépendance avec l'angle d'incidence et avec la longueur d'onde du déphasage à la réflexion sur un empilement de matériaux diffère, éventuellement fortement, de celle sur le miroir de référence, ce qui peut conduire à une variation du contraste des franges suivant la structure locale de l'objet (Voir Fig.20). Ces phénomènes rendent l'interprétation des données brutes très délicates dès que l'objet n'est pas constitué de simples variations d'altitude de la surface d'un matériau homogène épais [[Interferometric back focal plane microellipsometry] [Determination of fringe order in white-light interference microscopy]].



Microphotographie en lumière blanche avec objectif de Mirau 10×/0,30 de motifs de résine transparente sur un substrat de silicium. La différence de contraste des franges (en particulier de la frange noire d'ordre 0) entre les différentes régions est bien visible ici.

Figure 20 : Variation du contraste des franges données par un objectif de Mirau en fonction de la nature locale de l'objet

Microphotographie en lumière blanche avec objectif de Mirau $10\times / 0,30$ de motifs de résine transparente sur un substrat de silicium. La différence de contraste des franges (en particulier de la frange noire d'ordre 0) entre les différentes régions est bien visible ici.

3.3. Contraste interférentiel différentiel 'NOMARSKI'

a) Interférométrie à décalage latéral et contraste interférentiel différentiel

Le contraste interférentiel différentiel (CID, DIC en anglais pour 'Differential Interference Contrast') est une variante de l'interférométrie à décalage latéral. ('lateral shearing interferometry') où l'on fait interférer un front d'onde avec lui-même décalé transversalement. Lorsque le décalage est grand (Fig. 21a), cela conduit usuellement à l'apparition de franges d'interférence qui donnent des informations sur la forme du front d'onde (dans une direction) [Optical Shop Testing]]. L'interprétation n'est toutefois simple que si les détails intéressants du front d'onde sont localisés et séparés entre eux d'une distance supérieure au décalage ou si le front d'onde est d'une forme lisse ne contenant pas de hautes fréquences spatiales (e.g. polynômes de Zernike d'ordres faibles). Dans le cas d'un front d'onde formé par un objet complexe et étendu contenant des détails denses et de haute fréquence spatiale, l'interprétation devient délicate voire impossible et ce type d'interférométrie est donc peu utilisée en observation d'objets microscopiques. On lui préfère une version où le décalage latéral entre les deux fronts d'onde est plus petit que la résolution de l'objectif de microscope. Chaque point de l'image (dont la résolution est conservée) est alors modulé par un terme

d'interférence à deux ondes de la forme $\frac{1}{2}(1 + \cos(\Delta\varphi + \varphi_0))$ où le déphasage local $\Delta\varphi$ est en fait directement proportionnel à la pente locale (gradient) du front d'onde dans la direction du décalage (Fig. 21b). On transforme donc des gradients de phase en variations d'éclairement perceptibles par l'œil ou un détecteur. C'est cette propriété qui est à l'origine de la dénomination de *contraste interférentiel différentiel*. Le terme φ_0 est un paramètre, usuellement identique pour tous les points du champ observé, introduit par la mise en œuvre technique de la méthode. Il est souvent ajustable par un réglage disponible sur le microscope permettant à l'observateur de faire varier l'apparence de l'image qu'il observe. Une valeur de $\pm\pi/2$ (modulo π) est particulièrement intéressante car elle permet de directement visualiser le signe du gradient de phase de l'objet dans la direction du décalage, par une sur- ou une sous-brillance dans l'image sur un fond de luminosité moyenne, qui donne artificiellement l'impression de voir le relief de l'objet sous un éclairage latéral rasant.



Figure 21 : Représentation schématique de l'interférométrie à décalage latéral

- fronts d'onde dédoublés pour un large décalage
- fronts d'onde dédoublés pour un petit décalage.

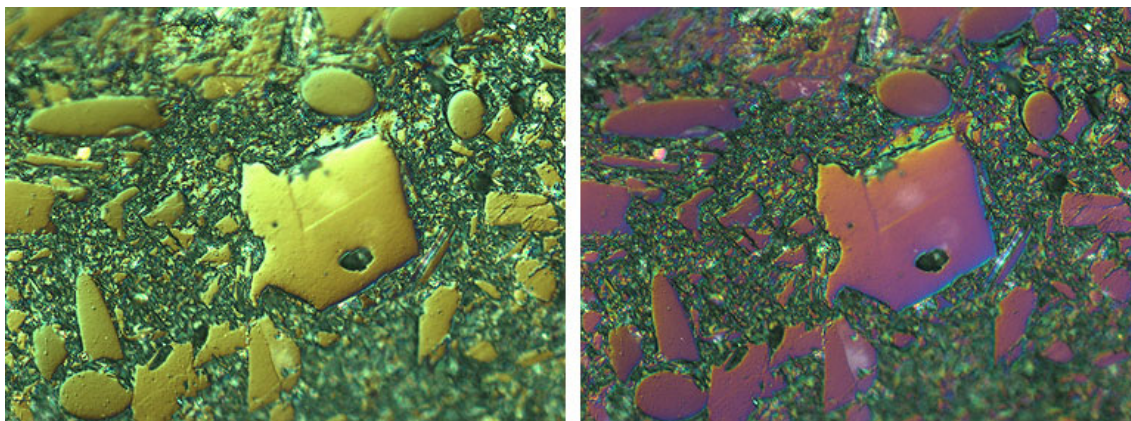
Complément

L'écart local d'altitude δ entre les deux surfaces est relié à la pente locale dans la direction du dédoublement.

δ est la différence de marche locale (signée) entre les deux fronts d'onde. Elle donne un déphasage local de $\Delta\varphi = 2\pi\delta/\lambda$.

Dans le cas d'un éclairage en lumière blanche et non pas monochromatique comme implicitement considéré dans les lignes précédentes, il faut considérer la superposition incohérente des différentes contributions monochromatiques. Comme $\Delta\varphi$ et φ_0 dépendent, dans le cas général, tous les deux de λ , l'image apparaît alors colorée par suite de la présence

de spectres cannelés (teintes de Newton, usuellement d'ordres faibles, de couleurs vives). Les contrastes de couleurs mettent en évidence les variations de phase introduits par l'objet, et donc, dans un certain sens, le 'relief' de l'objet observé (voir Fig.22)



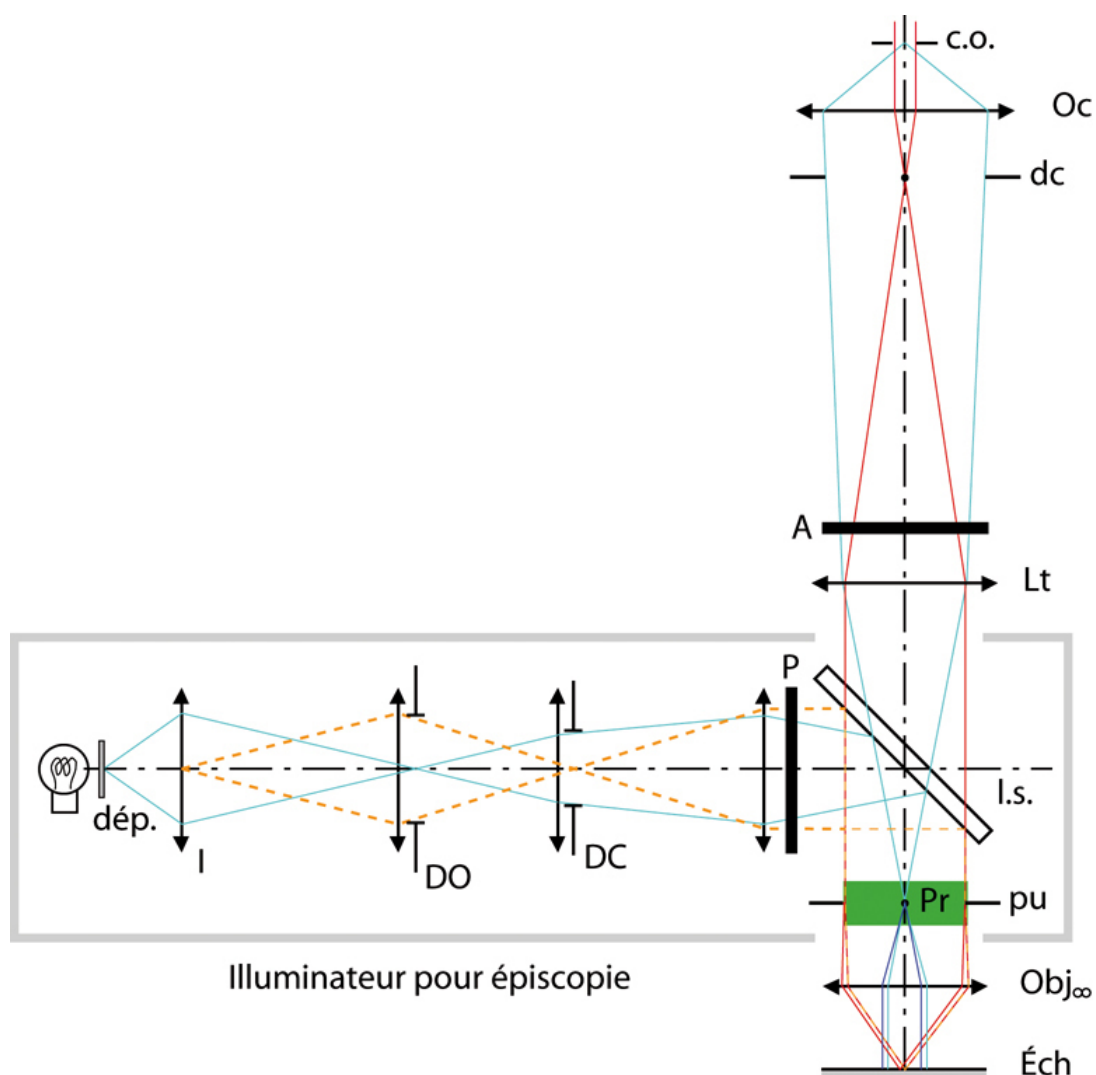
Microphotographies en lumière blanche avec un objectif $50\times/0,80$ avec contraste interférentiel différentiel pour deux réglages différents du paramètre φ_0 . La direction du décalage est à 45° de l'horizontal (NW-SE).

Figure 22 : Microphotographies en contraste interférentiel différentiel

La mise en œuvre 'classique' de l'interférométrie à décalage latéral en microscopie est réalisée à l'aide de prismes biréfringents utilisés en lumière polarisée. Le dispositif clef de la méthode est un (bi-)prisme de Wollaston placé au foyer image de l'objectif ou un (bi-)prisme de Nomarski placé en aval de ce même foyer image. Les deux prismes ont pour propriété de dédoubler un rayon incident en deux rayons formant un petit angle $\Delta\alpha$ entre eux. Repris de manière appropriée par l'objectif du microscope, ce dédoublement angulaire est transformé en déplacement latéral $|f| \cdot \Delta\alpha$ où f est la focale objet de l'objectif. Pour fixer les ordres de grandeur, pour un objectif $50/0,80$ de $\sim 4\text{mm}$ de focale et de résolution $r \approx 0,4\mu\text{m}$ [rayon de la tache d'Airy dans le visible], un déplacement des rayons dans le plan objet inférieur à la résolution pour bien être en mode de contraste interférentiel conduit à un angle $\Delta\alpha < r/|f| \approx 10^{-4}\text{rad} \approx 0,3'$, bien inférieur à la minute d'arc! Le paragraphe suivant présente les grandes lignes du fonctionnement en épiscopie, qui est le plus simple à réaliser et à comprendre.

b) Réalisation pratique en microscopie par réflexion

L'analyse des dispositifs ne peut être séparée de celle de l'éclairage du microscope pour correctement prendre en compte les problèmes de cohérence spatiale de la source. La Fig. 23 présente un schéma d'ensemble du microscope à CID avec l'éclairage **Köhler** épiscopique.



P : Polariseur **A** : Analyseur **Pr** : Prisme biréfringent (Wollaston ou Nomarski) ; voir détails Fig.24 et 25.
 (Les autres éléments du schéma ont été décrits dans le grain "Principes et utilisations de base du microscope" et sont également rappelés Fig.6)

Figure 23 : Schéma d'un microscope en contraste interférentiel différentiel épiscopique

La Fig.24a présente le schéma de principe du fonctionnement du CID utilisant un (bi-)prisme de **Wollaston**. Ce dernier est un composant constitué de deux prismes d'un matériau biréfringent uniaxe, le plus souvent du quartz, assemblé avec leurs axes croisés à 90° . Ce composant sépare angulairement tous les rayons qui le frappent. Le plan de localisation du dédoublement est placé dans le plan focal image de l'objectif du microscope, ce qui conduit au dédoublement transversal recherché dans le plan objet. Après réflexion spéculaire sur l'échantillon, les rayons dédoublement sont recombinés par le même prisme. Le fonctionnement optimal en terme de contraste d'interférence est obtenu, comme indiqué Fig.25, lorsque les lignes neutres du prisme de Wollaston sont orientées à 45° de la polarisation incidente et que l'analyseur est croisé ou parallèle au polariseur (de direction fixée pour être en TE sur la lame semi-réfléchissante de l'éclairage **Köhler** - revoir paragraphe sur le microscope polarisant en éclairage épiscopique).

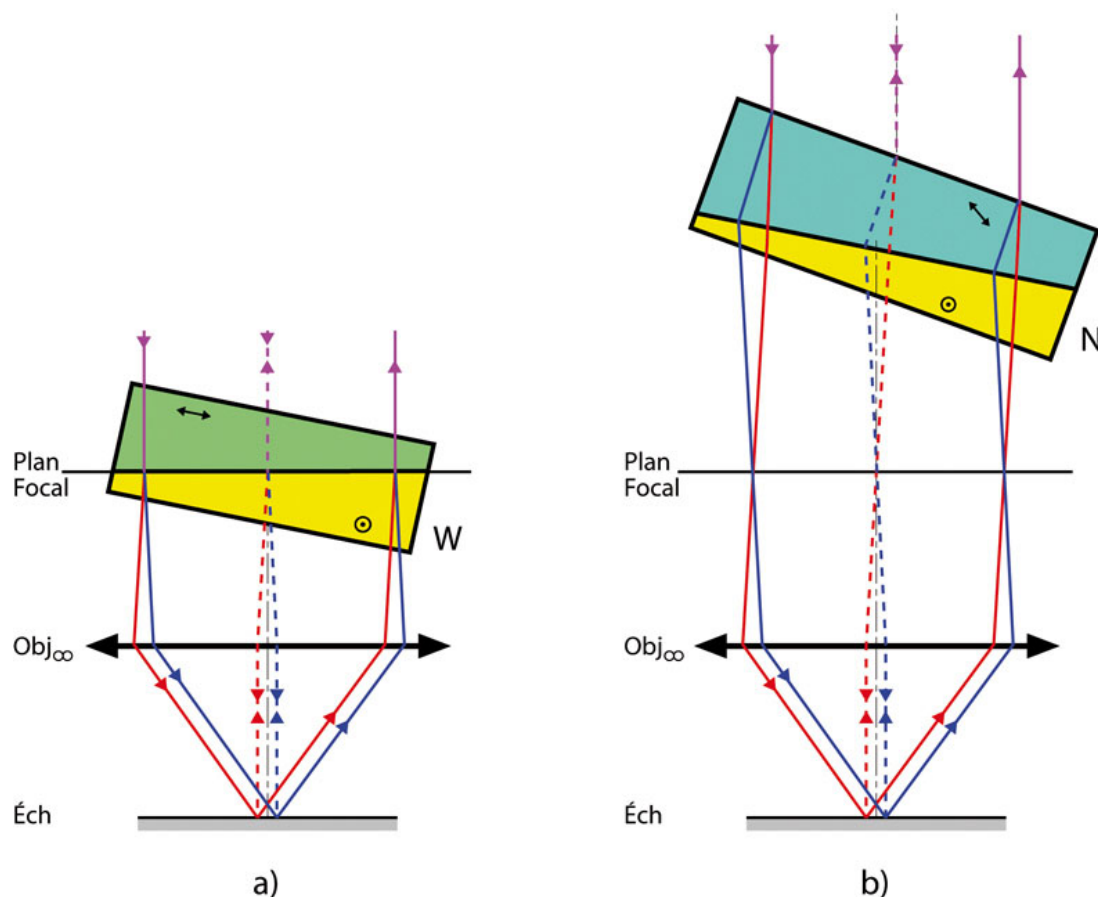


Figure 24 : Principe de la mise en œuvre du CID par prismes biréfringents

Les tracés des rayons dans les prismes sont simplifiés à l'essentiel [Un calcul quantitatif complet de la déviation pour un rayon particulier est proposé en exercice à la fin de ce grain]. Les rayons tracés sont limités au rayon principal et au rayon marginal pour le point central du champ. (Le basculement des prismes permet une localisation correcte du plan de séparation des rayons. Il a aussi l'intérêt d'éviter que les réflexions parasites de la lumière de l'éclairage épiscopique sur les faces du composant ne perturbent directement l'image observée dans l'oculaire).

Cependant, comme il a déjà été souligné dans le paragraphe sur le contraste de phase, le plan focal image de l'objectif est un endroit mécaniquement inaccessible puisqu'il coïncide avec le filetage des objectifs de microscope commerciaux actuels. Georges Nomarski³ a eu l'idée de modifier le prisme de Wollaston comme indiqué Fig. 24b [Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées]. Cette nouvelle configuration permet d'éloigner le prisme biréfringent du foyer de l'objectif tout en conservant un fonctionnement identique. Le prisme peut dès lors être monté sur glissière et être facilement inséré ou enlevé. Ce dispositif, connu sous le nom de *CID Nomarski* (ou *Nomarski DIC* en anglais), a fait l'objet d'un brevet exploité par tous les constructeurs de microscope.

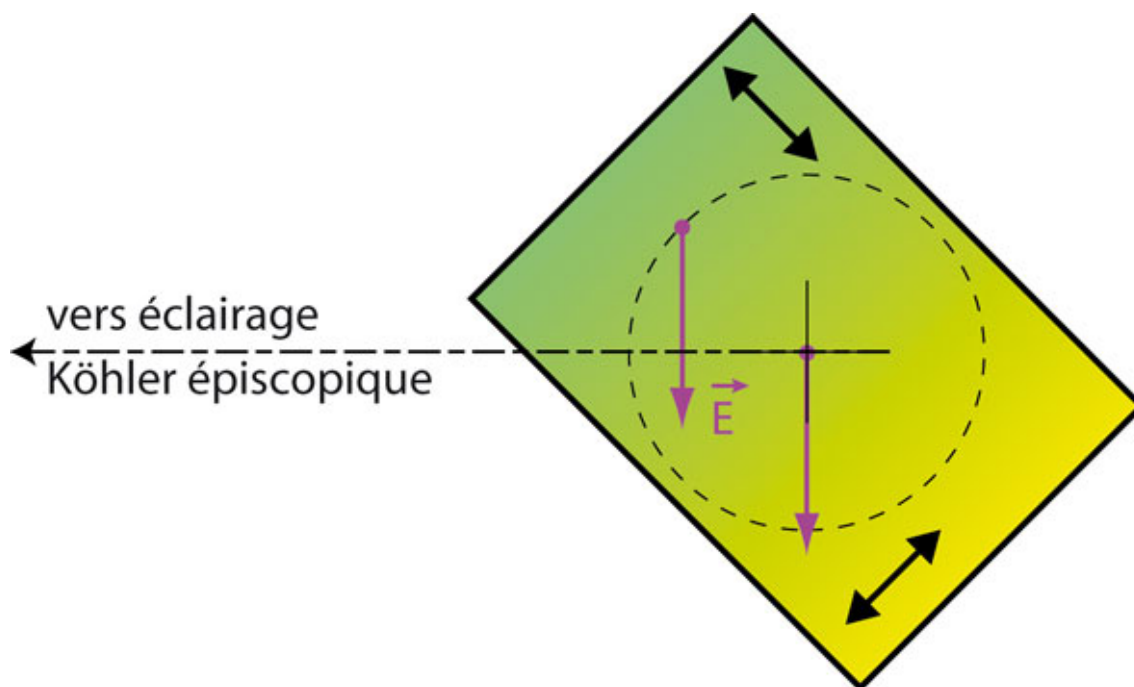


Figure 25 : Orientation de la polarisation des rayons incidents et des lignes neutres du prisme biréfringent

Vue de dessus du microscope en CID (Fig.23). La lumière incidente est polarisée rectilignement en TE sur la lame semi-réfléchissante de l'éclairage Köhler du microscope (revoir le paragraphe sur le microscope polarisant en épiscopie). Pour un contraste optimal des interférences, les lignes neutres du prisme biréfringent sont placées à 45° de cette polarisation. Cette orientation est en pratique imposée par la mécanique d'insertion du prisme dans le statif. L'analyseur, situé en aval, sera également de manière optimale orienté à 45° des lignes neutres du prisme (c'est à dire croisé ou parallèle avec le polariseur).

La mise en œuvre du contraste interférentiel différentiel **Nomarski** en réflexion sur un microscope épiscopique récent est très simple. Il suffit de mettre en service le polariseur et l'analyseur, de croiser l'analyseur avec le polariseur en tournant la molette d'orientation de l'analyseur, puis de mettre en service le prisme de Nomarski en l'enfonçant dans sa glissière prévue à cet effet.

Une vis moletée permet usuellement de translater le prisme dans son plan dans la direction du décalage des rayons d'une distance ξ ajustable. Un tel déplacement a pour conséquence de briser l'auto-compensation automatique de chemin optique des deux ondes qui interfèrent, lors des traversées aller et retour du prisme biréfringent (voir Fig.26 et cours d'interférences en lumière polarisée). On introduit donc dans le chemin optique l'équivalent d'une lame biréfringente d'épaisseur ajustable $e = \kappa \cdot \xi$ où κ dépend de l'angle interne du prisme. Ceci a pour conséquence de faire apparaître un terme $\varphi_0 \approx 2\pi \cdot \Delta n \cdot \kappa \cdot \xi / \lambda$ (où Δn est la différence entre les indices de l'axe lent et de l'axe rapide de la lame retardatrice équivalente) dépendant plus ou moins fortement de λ en fonction du réglage ξ . Ce terme de déphasage chromatique réglable fait apparaître des teintes ajustables lorsque l'on travaille en lumière blanche. En plaçant par exemple le fond de l'image à la teinte sensible (pourpre du premier ordre, extinction du vert dans le spectre cannelé), il est ainsi possible de voir en contraste coloré avec une très grande sensibilité les variations de pente sur le front d'onde (revoir Fig.22).

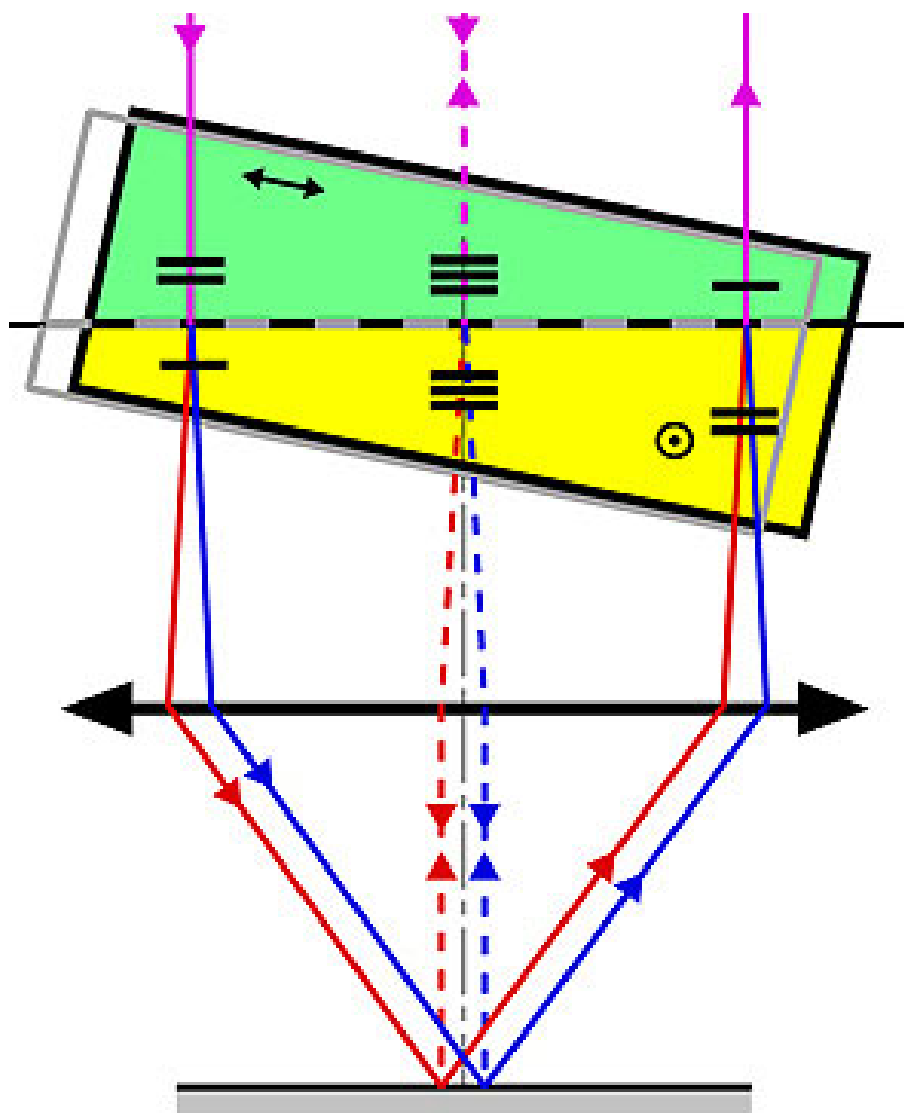


Figure 26 : Autocompensation de l'interféromètre en réflexion et décompensation volontaire par translation horizontale du prisme de Wollaston ou de Nomarski

Pour le dessin du prisme à traits noirs et fond de couleurs (bi-prisme 'centré' ou 'équilibré'), les traits horizontaux (-, = ou ≡) indiquent les chemins optiques (quasi-)égaux entre eux. Comme entre le prisme représenté en jaune et celui représenté en vert, il y a échange des indices ordinaires et extraordinaires pour un même rayon de polarisation propre donnée, il est facile de voir qu'après les passages aller et retour dans le bi-prisme, il y a compensation des différences de marche entre les deux polarisations pour tous les rayons incidents (pour un échantillon horizontal plan ne produisant pas d'effet interférométrique différentiel). Si le composant est traduit (dessin en traits gris), la compensation ne se produit plus et il existe une différence de marche non nulle entre les deux polarisations propres après le double passage dans celui-ci, cette différence de marche étant toutefois identique pour tous les rayons incidents considérés.

c) CID Nomarski en transmission

Il est également possible d'utiliser le contraste interférentiel différentiel en diascopie. Cependant, le prisme n'étant dans ce cas traversé qu'une seule fois par la lumière, il est nécessaire d'introduire une compensation externe. Ceci est usuellement réalisé en introduisant un prisme de Wollaston de caractéristique appropriée dans le plan du diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler (Voir Fig.27). Le prisme de Wollaston à insérer dans l'éclairage dépend évidemment du condenseur, de l'objectif du microscope et du prisme de Nomarski utilisés.

Pour couvrir leur gamme d'objectifs et de condenseurs, les fabricants de microscope commercialisent à cet effet un ensemble approprié de prismes de Wollaston et de prismes de Nomarski.

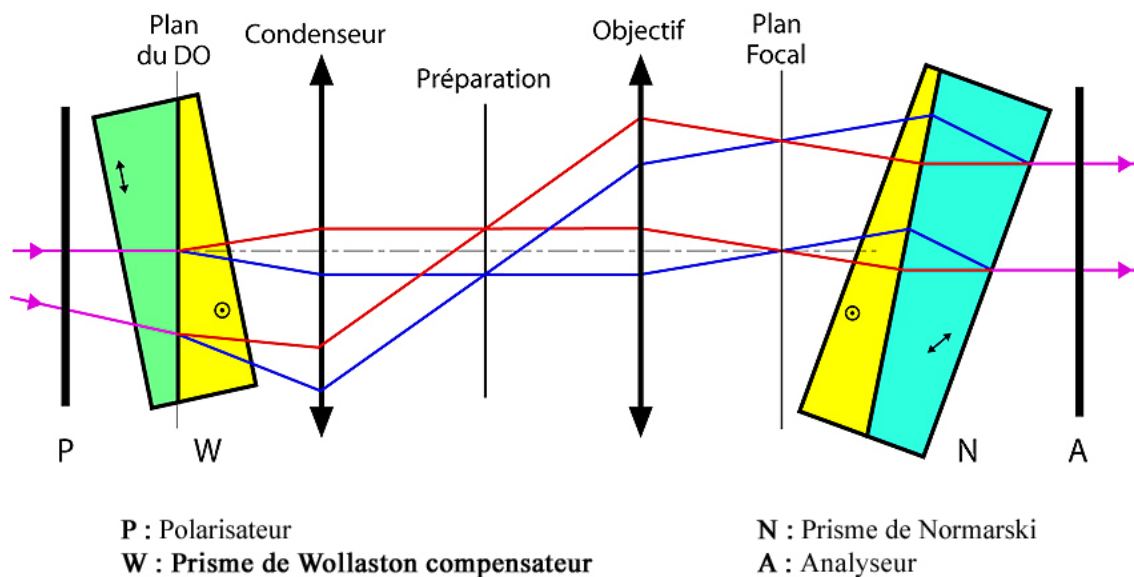


Figure 27 : Mise en œuvre du CID Nomarski en transmission

4. Microscopie de fluorescence

Certains objets microscopiques peu mis en évidence ou peu différenciés avec les techniques de contraste précédemment décrites présentent la propriété d'être *fluorescents*, c'est à dire de réémettre sur une bande de longueurs d'onde spécifique l'énergie lumineuse reçue sur une certaine plage de longueurs d'onde plus courtes. La mise en évidence de ces émissions par fluorescence s'avère souvent d'un grand intérêt car elle permet de différencier des objets apparemment identiques pour tout autre technique de visualisation. Certaines préparations sont naturellement fluorescentes. C'est souvent le cas des objets d'origine végétale (la chlorophylle, par exemple, fluoresce dans l'IR lorsqu'elle est excitée dans le rouge; d'autres composés naturels fluorescent dans le visible lorsqu'ils sont excités dans l'UV ou le violet/bleu). D'autres matériaux, comme certains polymères, présentent également cette propriété. Dans les autres cas l'adjonction de produits spéciaux (les 'fluorochromes') permettent de "marquer" très sélectivement certaines parties spécifiques de la préparation sur lesquelles ils se fixent préférentiellement. De nombreux domaines scientifiques et techniques de pointes, comme l'immunobiologie ou l'industrie des plastiques, font un grand usage de cette technique de visualisation.

L'observation de la fluorescence des objets microscopiques pose toutefois des problèmes délicats qui ne peuvent être surmontés que par la mise en œuvre de méthodes très spécialisées comme l'*épifluorescence* décrite dans le paragraphe suivant.

4.1. Principe de l'épifluorescence

Un premier problème provient des longueurs d'onde de la source d'excitation qui doivent toujours être courtes si l'on veut utiliser des substances qui fluorescent dans le visible. L'utilisation de sources fournissant une importante quantité de bleu, de violet et même très souvent d'ultraviolet est donc requise. Il faut alors généralement remplacer la simple lampe à

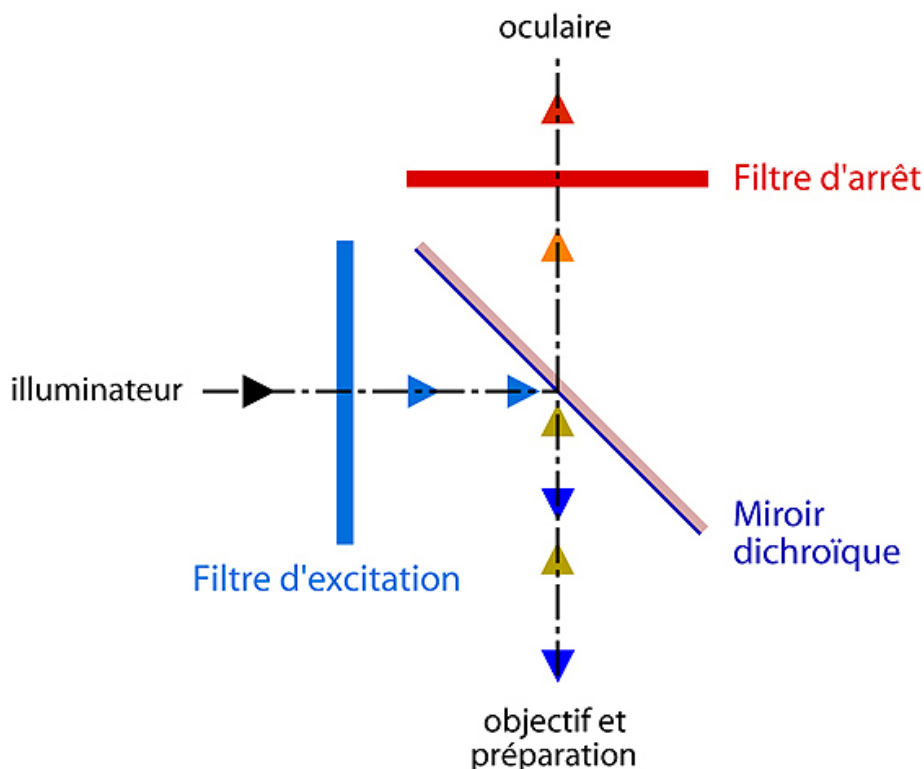
incandescence (lampe halogène) de l'éclairage Köhler par un 'brûleur' au Xénon ou un 'brûleur' HBO à vapeur de mercure. De surcroît, ces courtes longueurs d'onde imposent l'usage d'optiques en matériaux spéciaux tels la fluorine ou le quartz, les verres optiques standard absorbant fortement dans ce domaine spectral, la plupart étant même opaque dans l'ultraviolet. Tous les constructeurs proposent de telles optiques incorporant des éléments en fluorine, matériau qui permet par ailleurs d'améliorer la correction chromatique des objectifs en raison de sa dispersion très faible. Certains constructeurs proposent en plus des objectifs faits avec des matériaux de très grande pureté n'ayant aucune fluorescence propre qui pourrait voiler les images.

Le second et principal problème de la détection de la fluorescence des objets microscopiques provient du très faible rendement énergétique de ce mécanisme de conversion de longueur d'onde de flux lumineux. Les flux que l'on veut détecter sont extrêmement faibles alors même que l'éclairage, et sa diffusion standard par la préparation, sont violents. Pour rendre l'observation possible il faut amener le rapport signal sur bruit à un niveau acceptable. Pour cela on met usuellement à profit la séparation spectrale de l'excitation et du signal utile qu'il est donc possible de séparer par des filtrages appropriés.

Une méthode permettant de surmonter les difficultés précédemment évoquées est dénommée *épifluorescence* : la préparation est éclairée par le dessus avec un illuminateur épiscopique et l'observation de la fluorescence est effectuée dans une configuration de type microscopie par réflexion.

Un des avantages de ce "rétro-éclairage" provient du fait que les préparations observées sont usuellement plus transparentes que réfléchissantes. La lumière d'excitation réfléchie et rétro-diffusée, qui forme ici le flux lumineux parasite à éliminer, est donc nettement plus faible que la lumière transmise et diffusée vers l'avant qui formerait le flux parasite dans une configuration d'éclairage en ligne. Comme l'émission par fluorescence est un phénomène usuellement isotrope, le signal utile ne dépend pas du sens de l'éclairage, et le rapport signal sur bruit est donc nettement meilleur en épiscopie. Cet avantage est encore renforcé si l'on prend en compte la traversée de la préparation. Dans un cas, l'excitation ne doit traverser que la lamelle couvre objet ($0,17 \text{ mm}$), qui peut fort utilement être en quartz (ou même absente) si l'on travaille avec de l'UV, alors que dans l'autre cas elle doit traverser la lame porte objet ($\sim 1 \text{ mm}$) quasiment toujours en verre.

Un deuxième avantage de la configuration épiscopique réside dans la possibilité de réaliser un filtrage spectral efficace de l'excitation et du signal utile au niveau du bloc illuminateur. Pour travailler en épifluorescence on remplace la lame semi-réfléchissante de l'éclairage Köhler par réflexion (revoir Fig.6 ou 23) par un "cube" constitué de deux filtres et d'un miroir dichroïque dont le schéma est donné sur Fig.28.



Ce "cube" remplace la lame semi-réfléchissante standard de l'éclairage Köhler par réflexion.

Figure 28 : "Cube" pour illumination en épifluorescence

Le *filtre d'excitation* sélectionne dans le flux lumineux issu de la source les seules longueurs d'onde appropriées à l'excitation de la fluorescence de l'échantillon. Le *miroir dichroïque* réfléchit les courtes longueurs correspondant à l'excitation et transmet les plus grandes longueurs d'onde. Il renforce donc dans un premier temps l'effet du filtre d'excitation. La lumière issue de l'échantillon, qui contient la lumière de fluorescence et la lumière parasite de rétro-diffusion de l'excitation, frappe le miroir dichroïque. La fluorescence est transmise avec très peu de pertes alors que la majeure partie de la lumière parasite est réfléchi. Le faisceau lumineux atteint ensuite le *filtre d'arrêt* qui, par définition, bloque la lumière d'excitation parasite résiduelle et laisse passer la fluorescence. Avec des filtres et des miroirs de grande qualité, cette disposition permet d'obtenir d'excellents résultats avec une mise en œuvre très simple et très sûre pour l'utilisateur. Les constructeurs proposent en général de très nombreuses combinaisons de filtres et de miroirs dichroïques adaptées aux substances et fluorochromes couramment utilisés.

L'épifluorescence possède également l'avantage de permettre l'utilisation conjointe de la lumière transmise. Les images obtenues en fluorescence sont en effet généralement constituées de petites zones émissives disséminées dans un champ sombre et il est dans ces conditions très difficile d'identifier les objets à l'origine de la fluorescence. Il est dès lors très utile de pouvoir simultanément observer la préparation en diascopie. Ceci ne pose aucun problème pratique sur les microscopes récents disposant de deux blocs d'illumination séparés, l'un diascopique et l'autre épiscopique, dont on peut séparément régler la puissance. Il est de surcroît usuel d'utiliser la voie diascopique en contraste de phase pour améliorer la visualisation et l'identification des objets.

* *

*

La partie *cours* de ce grain a donc présenté les grandes lignes des principes des techniques les plus classiques d'amélioration du contraste et de la visualisation des objets utilisés en microscopie de nos jours. La lecture de la référence [[Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur (tome R7)]] ainsi que la consultation des sites Web <http://www.molecularexpressions.com/>⁹, <http://www.microscopyu.com/>¹⁰ ou encore, <http://www.olympusmicro.com/>¹¹ (tous trois en langue anglaise) peuvent donner des compléments intéressants sur le sujet.

9 - <http://www.molecularexpressions.com/>

10 - <http://www.microscopyu.com/>

11 - <http://www.olympusmicro.com/>

III. Etudes de cas

1. Technique utilisant la polarisation

1.1. Diascopie

Ce type d'observation permet de connaître les propriétés optiques des constituants, il est surtout utilisé en géologie pour déterminer les différents types de cristaux constituant une roche.

La figure 1 est l'image d'une lame de granit de $30\mu m$ d'épaisseur observée en transmission en lumière naturelle (a) puis en lumière polarisée.

Les cristaux biréfringents, font apparaître des teintes de Newton caractéristiques de leur biréfringence et de l'épaisseur de la lame.

Les trois cristaux constitutifs du granit sont le quartz, le mica et le feldspath. Les différentes variétés de feldspath (plagioclases) sont très semblables, ils ne peuvent être distingués que par des méthodes optiques.

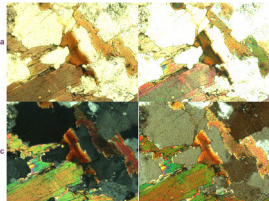


Figure 1 : Lame mince de granit d'épaisseur $30\mu m$ observée en transmission avec un objectif $\times 10$.

(a) : lumière naturelle, (b) : lame entre polariseurs parallèles, (c) la lame entre polariseur croisés, (d) position quelconque des deux polariseurs l'un par rapport à l'autre.

Remarque

Les géologues se placent en général entre polariseur et analyseur croisés, font ensuite tourner la lame dans son plan observent la variation des teintes des cristaux. À l'aide du tableau de Michel-Lévy, ils déterminent l'ordre de grandeur de la biréfringence des cristaux. Connaissant l'épaisseur de la lame ils en déduisent la nature des cristaux parmi les matériaux possibles sélectionnés à partir de connaissances purement géologiques.

La figure 2 est une représentation simplifiée du tableau de Michel-Lévy.

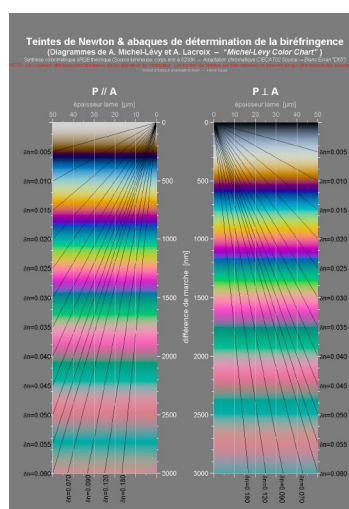


Figure 2 : Teintes de Newton et abaques de détermination de la biréfringence

Sur la partie gauche de la figure 2, sont représentées les teintes de Newton lors d'une observation entre polariseur et analyseur parallèles ; sur la partie droite on retrouve ces teintes entre polariseur et analyseur croisés. L'épaisseur e de la lame est indiquée sur l'échelle du haut, elle croit de gauche à droite de 0 à $50\mu\text{m}$.

En blanc, au centre, est indiquée la différence de marche introduite entre l'onde plane liée à l'axe lent et l'onde plane liée à l'axe rapide de la lame retardatrice. Au-delà de l'ordre d'interférence 3 (aux alentours de $\delta = 1700\text{nm}$) les teintes deviennent très pâles, elles sont délavées de blanc.

Attention

Le géologue peut utiliser ce diagramme de la façon suivante :

- par comparaison visuelle il détermine la teinte du diagramme qui correspond à celle observée sur l'échantillon. Pour lever des ambiguïtés, il tourne l'analyseur de 90° pour voir si la couleur complémentaire correspond bien.
- il détermine la droite noire qui passe à l'intersection de l'horizontale déterminée par la couleur et de la droite blanche verticale donnée par l'épaisseur de la lame,
- enfin il lit la valeur de $|\delta n|$ correspondant.

Dans le cas présenté (figure 1) on observe un gros cristal de quartz en haut et à gauche de la photographie qui apparaît blanc entre polariseurs parallèles et noir entre polariseurs croisés. Cela peut s'interpréter de la façon suivante : un des axes neutres de la lame de quartz se trouve par hasard dans le plan de la lame et parallèle au polariseur. Pour une autre orientation relative du polariseur P et du cristal, ce dernier étant toujours taillé parallèlement à l'axe, on verrait apparaître des couleurs plus marquées.

Conseil

En effet pour observer les teintes de Newton les directions des axes neutres du cristal doivent être à $\pm 45^\circ$ de celle du polariseur.

Dans ce dernier cas, compte tenu que l'épaisseur de la lame est de $30\mu\text{m}$ et la biréfringence du quartz est de 9.10^{-3} , la différence de marche est égale à 270nm , ce qui correspondrait à une teinte jaune paille entre polariseur et analyseur croisés et rouge sombre entre polariseur et analyseur parallèles. Une autre possibilité s'offre à nous : le cristal pourrait être taillé perpendiculairement à l'axe optique, ce dernier étant alors parallèle à l'axe du microscope. Dans ce cas la rotation de la lame ne ferait apparaître aucune teinte colorée particulière.

Sur la figure 1d, P est resté inchangé, seul A a tourné, il n'y a toujours pas de teinte de Newton, l'intensité décroît suivant la loi de Malus.

En bas à gauche de la photographie on distingue un mica dit "noir" ou biotite de couleur brune entre polariseurs parallèles et jaune bordé de teintes de Newton entre polariseurs croisés. Ces teintes proviennent certainement du fait que la direction des axes optiques des polycristaux diffère. Enfin le feldspath correspond aux cristaux situés sur la droite de couleur blanche entre polariseurs parallèles et bleu-gris soutenu entre polariseurs croisés.

Remarque

Il est à noter que lors d'une observation, on n'a pas accès directement à la valeur absolue de la biréfringence ($n_e - n_o$) dans le cas d'un milieu uniaxe mais seulement à un minorant de cette grandeur car l'axe optique n'a aucune raison d'être dans le plan de la coupe de la roche. On évalue en fait la grandeur $n_\theta - n_o$, où n_θ représente l'indice du cristal suivant la direction de propagation du rayon extraordinaire.

Pour une incidence normale (perpendiculaire au dioptre d'entrée), les rayons ordinaire et extraordinaire sont confondus à la sortie de la lame d'épaisseur mais il existe entre eux une différence de marche puisque suivant l'axe de propagation le rayon extraordinaire "voit" l'indice n_θ comme cela est illustré sur la figure 3.

Il en est de même dans le cas d'un cristal biaxe où l'on n'accède qu'à la différence de deux indices situées entre le plus grand et le plus petit des indices propres du matériau.

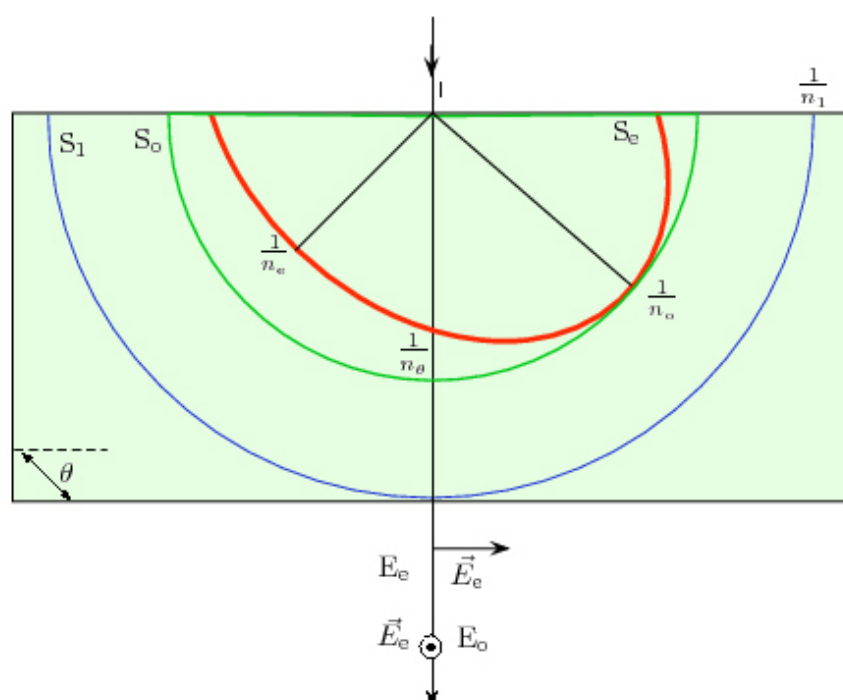


Figure 3 : Tracé des surfaces d'onde ordinaire et extraordinaire pour une onde plane monochromatique se propageant dans une lame biréfringente positive dont la direction de l'axe optique fait un angle θ avec le dioptre d'entrée

La technique permet par exemple de contrôler des pièces moulées en polyamide ou en polyoxyméthylène dont la cristallisation doit être régulière sur l'ensemble de la pièce. On peut la trouver aussi pour des contrôles de membrane pour dialyseur en acétate de cellulose.

1.2. En épiscopie

La photographie de gauche de la figure 4 montre des grains dans une structure d'aluminium. Ces grains se différencient peu les uns des autres. Avec un microscope polarisant ils sont mieux discernés, car les niveaux de gris diffèrent d'un grain à l'autre. Cette différence de teinte provient du fait que les orientations cristallographiques changent d'un grain à l'autre.

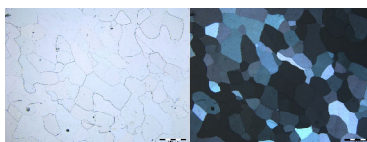


Figure 4 : L'observation entre polariseurs croisés permet de bien mettre en évidence les différents grains d'aluminium

Pour augmenter cette différenciation, le service métallographique de l'École des Mines de Saint Étienne dépose sur la préparation une couche d'alumine d'épaisseur 150 nm et une lame onde pour $\lambda = 530 \text{ nm}$. Les grains apparaissent ainsi sous différentes couleurs (figure 5).

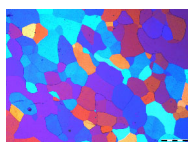


Figure 5 : Mise en évidence des différents grains à l'aide des teintes de Newton

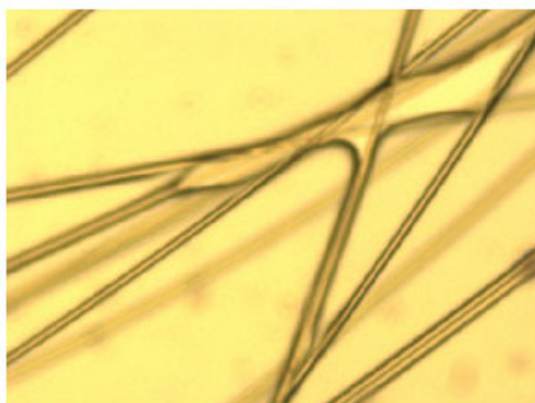
Pour plus de détails, vous pouvez consulter ce lien¹².

2. Fond noir ou strioscopie

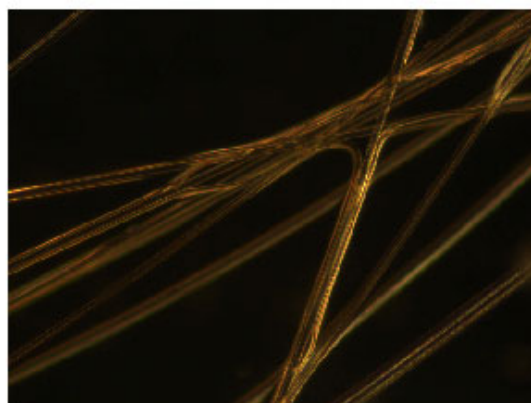
La technique est basée sur le filtrage des fréquences spatiale. Elle permet de révéler la présence mais pas la structure des défauts ou des irrégularités non perceptibles en fond clair. Elle est aussi utilisée pour l'observation d'objets peu réfléchissant comme le papier, les fibres, le plastique et les matériaux composites.

2.1. Diascopie

L'observation en fond noir de fines fibres synthétiques est plus agréable qu'en fond clair car le contraste est accentué, les fibres se détachent parfaitement sur le fond noir.



a) Fibres synthétiques observées en fond clair



b) Fibres synthétiques observées en fond sombre

Figure 6 : Fibres synthétiques observées en fond clair et noir

12 - <http://www.olympusmicro.com/primer/java/polarizedlight/crystal/index.html>

2.2. Épiscope

La technique se prête à l'examen de structure semi-opaque, contrastées par des reflets internes ou de structures planes présentant une diffusion de la lumière au niveau des bords de grains.

Remarque

Ainsi la photographie de l'empreinte Vickers lors d'une mesure de dureté prise en fond clair ne permet pas de voir le fond de l'empreinte, par contre en fond noir la lumière diffusée à l'intérieure de l'empreinte est bien perçue.

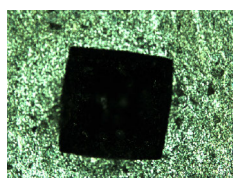


Figure 7

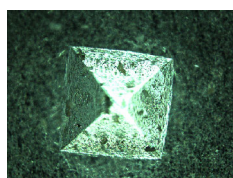


Figure 8 : Intérieur d'une empreinte perçue lors d'une observation en fond noir

La technique permet aussi de révéler les oxydes d'aluminium des sulfures de manganèse dans un acier. Sur la photographie **a)** de la figure 9 en fond clair on distingue difficilement les sulfures de manganèse des oxydes d'aluminium ; par contre sur la photographie **b)** les oxydes d'aluminium sont parfaitement localisés, ils correspondent aux points brillants sur la photographie.

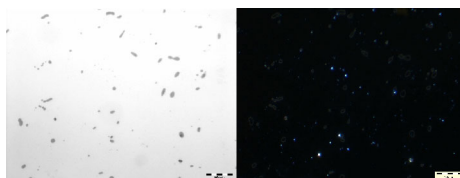


Figure 9 : Mise en évidence des oxydes d'aluminium dans un acier

3. Technique du contraste de phase

3.1. Diascopie

Les différences d'absorption des structures des cellules ou des micro-organismes ne sont souvent pas suffisamment différentes pour permettre une observation contrastée. La coloration du spécimen, technique à laquelle on peut avoir recours pour augmenter le contraste, a le gros inconvénient de tuer la cellule comme dans l'exemple de la figure 10.

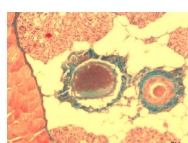


Figure 10 : Coupe de glande mammaire de rat d'épaisseur 14 μm , colorée ; microscope équipé d'un objectif x10

A gauche on distingue des fibres musculaires au centre de la photographie une veine avec une paroi coloré en bleu moins épaisse que pour l'artère située sur sa droite.

La technique du contraste de phase permet de remédier à cet inconvénient et autorise l'observation de cellules vivantes. Son avantage par rapport à d'autres techniques est son insensibilité à la polarisation et à la biréfringence.

Sur la figure 11, l'observation est faite en fond clair, on devine à peine la limite de la cellule située au centre de la moitié supérieure de la photographie. Par contre en contraste de phase la cellule est facilement repérée avec son noyau. Un inconvénient lié à cette technique est la présence d'un halo blanc sur le pourtour des cellules. Il devient alors difficile de discerner précisément le bord de la cellule.

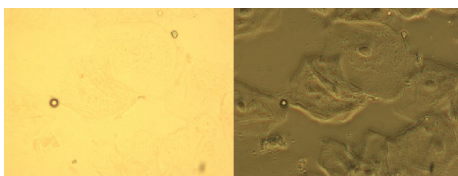


Figure 11 : Cellules épithéliales en fond clair (a) et en contraste de phase (b), objectif utilisé x40

On peut aussi mettre en évidence des défauts qui se produisent lors de la transformation de matières plastiques amorphes comme le polystyrène modifié lors des moulages par injection quand les températures du moule et de la matière plastique ne sont pas correctes ou que la pression d'injection a évolué.

4. Contraste interférentiel différentiel DIC en épiscopie

4.1. Épiscopie

Le dispositif permet de visualiser en relief et en couleur les dénivellés géométriques caractérisant des détails d'objet comme des alliages métalliques non découpés, des polymères renforcés par fibre ou des wafers polis (figure 12). C'est un procédé qualitatif.

La différence de marche mise en évidence par interférences est une fonction linéaire de la pente de la différence de marche introduite par l'objet. On ne visualise donc pas les variations de phase mais les gradients de phase

L'observation se fait entre polariseurs croisés ; suivant la position du prisme de Nomarski le fond de l'image peut être gris ou coloré (figures 12 et 13). Même s'il n'y a aucun objet microscopique sur le trajet optique il peut y avoir un grand nombre de phénomènes colorés différents ; ils ne doivent pas être considérés comme des objets, ils sont dans ce cas liés à des propriétés de l'appareil.

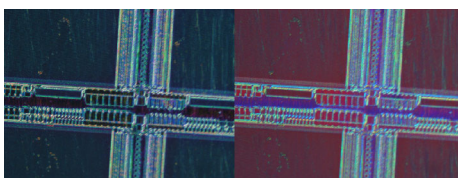


Figure 12 : Wafer

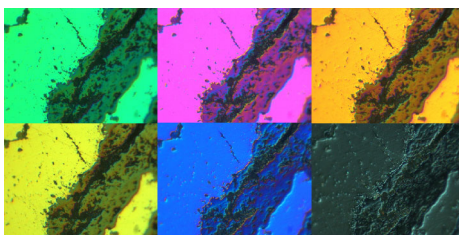


Figure 13 : Suivant la position du prisme de Nomarski, la couleur du fond de l'image varie, observation d'un cordon de soudure carboné ; microscope équipé d'un objectif x50

L'image révèle des grandeurs physiques différentes entre les deux trajets optiques de la lumière séparée par le prisme de Nomarski. En lumière réfléchi, la différence de marche introduite par l'objet dépend de son profil géométrique et du déphasage qui a lieu lors de la réflexion sur celui-ci.

Dans la photographie 14 le contraste interférentiel différentiel révèle les carbures de chrome noyés dans la matrice d'acier.

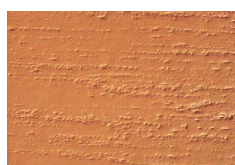


Figure 14 : Mise en évidence des carbures de chrome

La figure 15 d'un alliage d'aluminium et de silicium montre que lors de la phase de refroidissement primaire lente il y a eu formation de gros grains correspondant à la formation d'une solution solide Al(Si) puis, la température continuant à diminuer le palier eutectique (577°C) a été atteint avec formation d'aiguilles de silicium.



Figure 15 : Observation en contraste interférentiel différentiel d'un alliage d'aluminium et de silicium pour 2 positions différentes du prisme, de Nomarski les photographies (a) et (b) sont prises avec un objectif x10

La figure 16 correspond à l'image d'un poinçon réalisé lors d'une mesure de dureté Vickers observé en contraste interférentiel différentiel pour deux positions différentes du prisme de Nomarski, les différences de couleurs mettent en évidence une déformation localisée au niveau de l'empreinte.

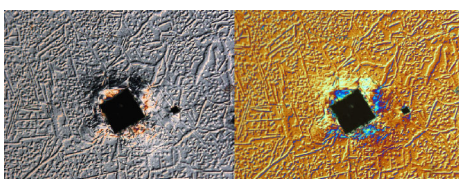


Figure 16 : Observation d'une empreinte de dureté Vickers dans un cordon carboné en contraste interférentiel différentiel avec un microscope équipé d'un objectif x10

Le relief qui apparaît sur des prises de vue en DIC n'est qu'un artefact de la méthode. L'échantillon semble éclairé en lumière rasante. Les ombres et les surbrillances ne représentent que des variations de la différence de marche entre les deux trajets de la lumière et non une variation de hauteur. La figure 16 met bien en évidence cet artefact car on peut remarquer que les reliefs sont inversés sur les photographies **a)** et **b)**.

IV. Exercices

1. Cheminement des rayons à l'intérieur d'un prisme de Wollaston

On rappelle qu'un prisme de **Wollaston** est constitué de deux prismes à angle droit taillés dans le même cristal biréfringent uniaxe, en général du quartz. Les deux prismes sont taillés parallèlement et les deux axes optiques sont perpendiculaires entre eux. Pour simplifier l'exercice, on se restreint aux rayons pour lesquels le plan (x, z) perpendiculaire aux arêtes du prisme de Wollaston est plan d'incidence.

Question 1

[Solution n°1 p 45]

Réaliser la constructions de Huygens pour expliquer le cheminement des rayons ordinaire et extraordinaire dans le prisme de Wollaston pour un angle d'incidence nul.

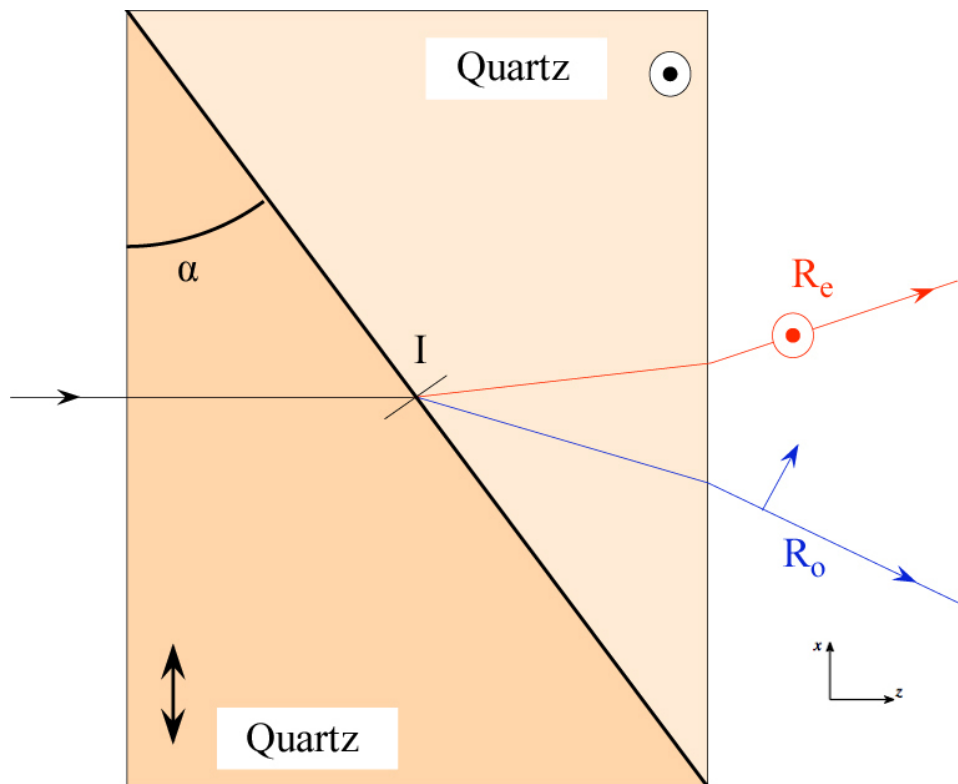


Figure 1 : Prisme de Wollaston

Question 2

[Solution n°2 p 48]

Démontrer que l'angle formé entre le rayon ordinaire et extraordinaire vaut sensiblement : $2(n_e - n_o) \tan \alpha$

Question 3

[Solution n°3 p 48]

Ce prisme de Wollaston est utilisé avec un objectif corrigé à l'infini de focale 4 mm (grandissement 50 en association avec une lentille de tube de 200 mm) et d'ouverture numérique 0,8. Quelle doit être la valeur de l'angle α si on veut que les rayons ordinaire et extraordinaire soient séparés d'un angle égal au $2/3$ de la résolution de l'objectif dans son espace image, c'est à dire, d'après le critère de Rayleigh pour un objectif limité par la

diffraction, au $2/3$ du rayon angulaire de la tache d'Airy ? (Les indices ordinaire et extraordinaire du quartz dans le visible sont $n_o \approx 1.544$ et $n_e \approx 1.553$).

Pour résoudre ce problème il est indispensable de revoir le cours sur les milieux biréfringents ([[Optique instrumentale Optique de Fourier]] pour une approche simplifiée et [[Polarisation de la lumière]] pour approfondir le sujet).

2. Contraste interférentiel dans le cas d'un microscope en transmission

Deux prismes de Wollaston identiques à celui étudié précédemment sont positionnés l'un au niveau du foyer objet du condenseur, l'autre au niveau du foyer image de l'objectif. Ces deux prismes sont placés entre polariseurs croisés, orientés à $\pm 45^\circ$ des axes des prismes.

Question 1

[Solution n°4 p 48]

Exprimer le décalage latéral d entre le rayon extraordinaire et ordinaire.

Question 2

[Solution n°5 p 49]

Montrer que le système visualise le gradient des variations de phase du spécimen. Pour simplifier on considérera que la source est monochromatique.

Solution des exercices

>Solution n°1 (exercice p. 43)

La direction z correspond à la direction de propagation de la lumière et (x, z) est le plan d'incidence. Sur l'animation présentée ci-dessous, le premier prisme atteint par la lumière est de couleur verte avec un damier mauve, le second est de couleur bleue. En I sont représentées trois surfaces d'ondes : une mauve de forme sphérique correspondant à la surface d'onde ordinaire des deux prismes ; une seconde de couleur gris-vert relative à la surface d'onde extraordinaire du premier prisme et enfin la troisième rouge représentant la surface d'onde extraordinaire du second prisme. Le quartz étant un cristal positif les surfaces d'onde ellipsoïdales sont à l'intérieur de la surface d'onde sphérique.

La surface d'onde correspondant au rayon ordinaire dans le premier prisme est tangente à l'ellipsoïde couleur gris-vert relative à la surface d'onde extraordinaire, la direction de tangence étant parallèle à la direction de l'axe optique dirigé suivant l'axe x . Cette surface d'onde ordinaire est aussi tangente à l'ellipsoïde de couleur rouge relative à la surface d'onde extraordinaire dans le second prisme, la direction de tangence étant maintenant parallèle à l'axe y .

L'animation montre ces surfaces d'onde sous différents angles de vue. La première prise de vue correspond à la figure 2 puis la caméra se déplace pour se positionner face au plan (y, z) et enfin remonte pour se trouver face au plan d'incidence (x, z) . La figure 3 correspond à la dernière vue de l'animation.

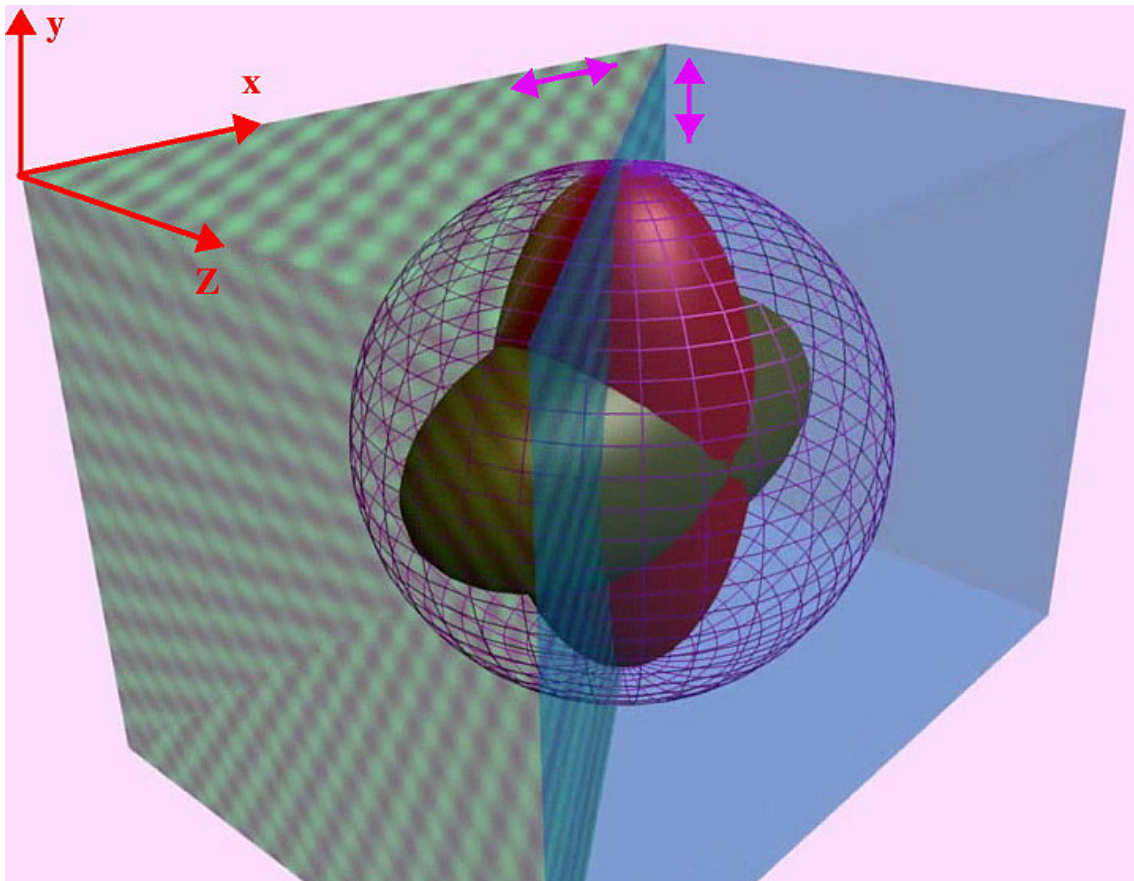


Figure 2 : Surfaces d'onde en 3D

Sur la figure 3 sont représentées ces surface d'onde, les prisme étant vus de dessus suivant la direction y . Cette figure est reprise sous forme de schéma figure 4.

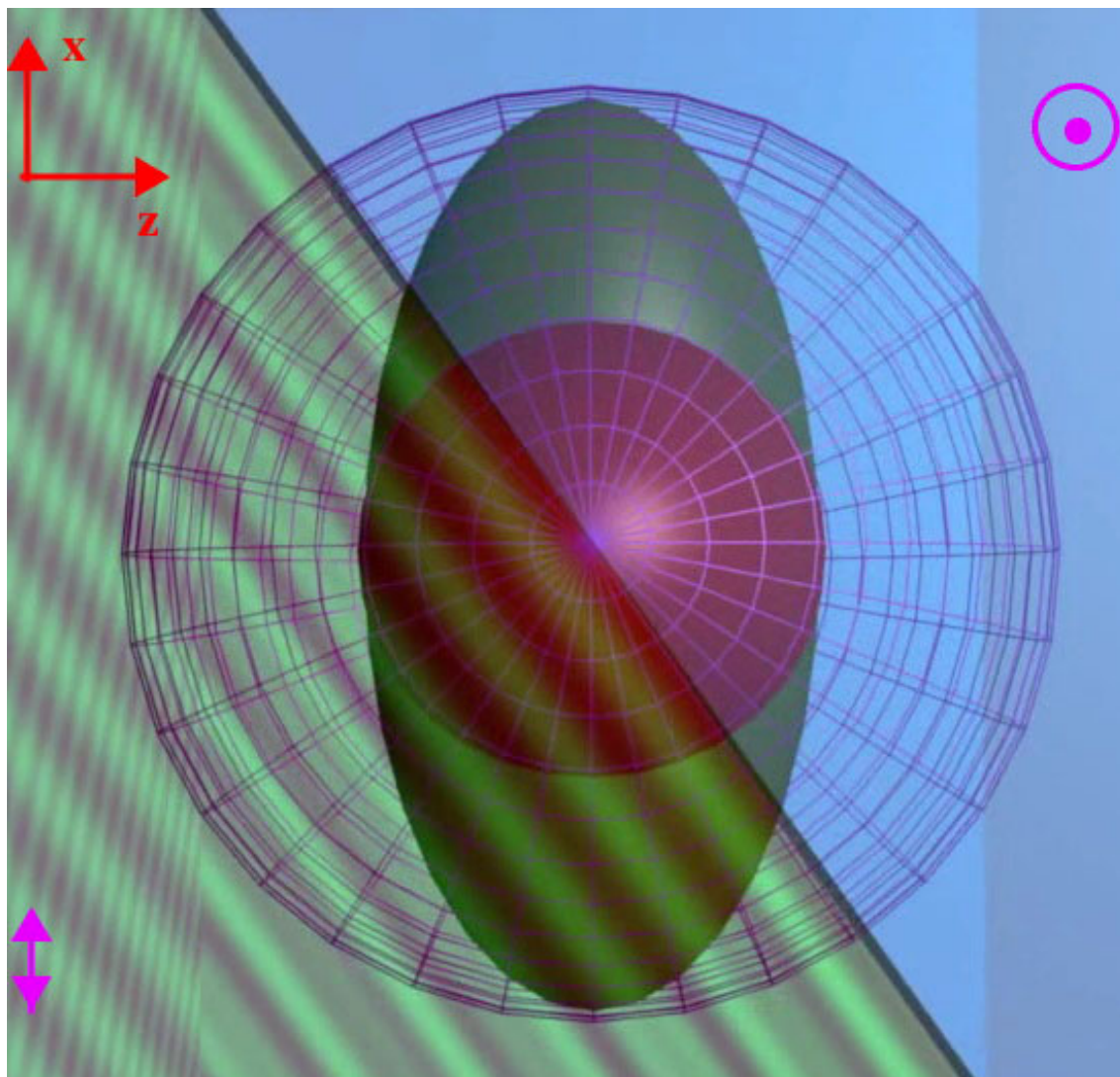


Figure 3 : Surfaces d'onde correspondants à la figure précédente vues de dessus

À partir de là, on raisonne sur la figure 4. Puisque l'angle d'incidence est nul au niveau du premier dioptré, l'angle de réfraction est aussi nul, dans le premier prisme les rayons ordinaire et extraordinaire sont confondus. Par contre ils se propagent à des vitesses différentes. L'épaisseur de la colle entre les deux prismes agit comme une lame à faces parallèles de très faible épaisseur. La légère translation du rayon due à cette lame est négligée.

Les axes des deux prismes étant croisés le rayon ordinaire dans le premier prisme devient extraordinaire dans le second et vice-versa. Sur la seconde animation est représentée la propagation du vecteur champ électrique. La lumière incidente est polarisée rectilignement avec une direction faisant 45° avec les directions des lignes neutres des cristaux de quartz des deux prismes. Les deux composantes du vecteur champ électrique sont dirigées suivant ces lignes neutres. Dans l'air ces composantes sont représentées en noir.

Lors du passage d'un dioptré, pour visualiser le phénomène des cercles concentriques sont représentés. Ils sont là juste pour attirer l'attention mais il ne correspondent à aucun phénomène physique.

Dans le premier prisme, la composante représentée en rouge est relative au rayon extraordinaire, celle en bleu au rayon ordinaire. Cette dernière se propage plus vite car le cristal est positif.

Lors du passage dans le second prisme les rôles des rayons ordinaire et extraordinaire sont échangés puisque les axes des cristaux sont croisés.

Dans l'air les deux composante se propagent à nouveau à la même vitesse.

Pour le premier prisme, le plan principal est contenu dans le plan d'incidence qui est confondu avec le plan de la figure 4, les surfaces d'ondes relatives aux rayons ordinaire et extraordinaire sont notées $S_{o,1}$ et $S_{e,1}$. Pour le second prisme la surface d'onde sphérique $S_{o,2}$ relative au rayon ordinaire est confondue avec $S_{o,1}$ puisque les deux prismes sont usinés dans le même matériau. Par contre pour la surface d'onde extraordinaire $S_{e,2}$, le grand axe de l'ellipse est perpendiculaire au plan de figure puisque l'axe optique est perpendiculaire au plan d'incidence. La prolongation du rayon incident ordinaire coupe la surface d'onde ordinaire en un point O . Le plan d'onde $P_{o,1}$ tangent en O coupe le dioptre de séparation des prismes en K . Lors de la réfraction aucun déphasage n'est introduit, le plan d'onde réfracté passe aussi par le point K . Ce plan d'onde $P_{e,2}$ est relatif au rayon extraordinaire puisque comme nous l'avons déjà dit les axes des deux prismes étant croisés le rayon ordinaire dans le premier prisme devient extraordinaire, ce plan est tangent en un point A à la surface d'onde extraordinaire $S_{e,2}$ du deuxième prisme. Par le point A passe le rayon extraordinaire R_e . Au niveau du dioptre entre le second prisme et l'air, les lois de Descartes s'appliquent simplement :

$$n_e \sin i_e = n \sin I_e$$

n représentant l'indice du milieu extérieur qui est en général de l'air.

De la même façon, la prolongation du rayon incident extraordinaire coupe la surface d'onde extraordinaire en un point E . Le plan d'onde $P_{e,1}$ tangent en E coupe le dioptre de séparation des prismes en K' . Lors de la réfraction aucun déphasage n'est introduit, le plan d'onde réfracté passe par le point K' . Ce plan d'onde $P_{o,2}$ est relatif au rayon ordinaire les axes des deux prismes étant croisés (le rayon extraordinaire dans le premier prisme devient ordinaire), ce plan est tangent en un point B à la surface d'onde ordinaire $S_{o,2}$ du deuxième prisme. Par le point B passe le rayon ordinaire R_o . À la sortie du second prisme les lois de Descartes s'appliquent de nouveau :

$$n_o \sin i_o = n \sin I_o$$

n représentant l'indice de l'air.

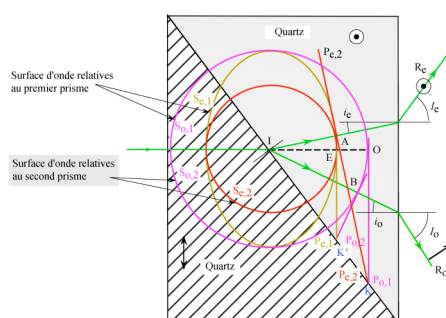


Figure 4 : Trajectoires des rayons lumineux dans un prisme de Wollaston

Remarque

Ce type de construction donne accès à la direction des rayons, c'est à dire au flux d'énergie (direction des vecteurs de Poynting) et non pas à la direction des vecteurs d'onde. Elle correspond aux constructions classiques d'optique géométrique qui donnent la trajectoire de l'énergie. Cependant dans le cas particulier traité, incidence normale et traversée du prisme de Wollaston dans ce sens, il n'y a pas de différence entre les directions des vecteurs de Poynting et les directions des vecteurs d'onde dans les deux prismes et dans l'air (cela provient, entre autre, du fait que la coupe de l'ellipsoïde avec le plan d'incidence se trouve être un cercle dans le deuxième prisme).

>Solution n°2 (exercice p. 43)

Au niveau du dioptre de séparation entre les deux prismes l'angle d'incidence des rayons ordinaire et extraordinaire est égal à l'angle du prisme α . En appliquant la loi de Descartes au point I :

$$n_o \sin(\alpha) = n_e \sin(\alpha - i_e) = n_e [\sin(\alpha) \cdot \cos(i_e) - \cos(\alpha) \cdot \sin(i_e)]$$

$$n_e \sin(\alpha) = n_o \sin(\alpha + i_o) = n_o [\sin(\alpha) \cdot \cos(i_o) + \cos(\alpha) \cdot \sin(i_o)]$$

Les angles i_e et i_o étant faibles :

$$n_o \sin(\alpha) \approx n_e \cdot \sin(\alpha) - \cos(\alpha) \cdot n_e i_e$$

$$n_e \sin(\alpha) \approx n_o \cdot \sin(\alpha) + \cos(\alpha) \cdot n_o i_o$$

Soit :

$$\sin(\alpha)[n_e - n_o] = n_e i_e \cdot \cos(\alpha)$$

$$\sin(\alpha)[n_e - n_o] = n_o i_o \cdot \cos(\alpha)$$

ou encore :

$$n_e i_e = (n_e - n_o) \cdot \tan(\alpha)$$

$$n_o i_o = (n_e - n_o) \cdot \tan(\alpha)$$

A la sortie du second prisme dans l'air, au niveau du troisième dioptre en considérant que l'indice n de l'air est égal à 1 :

$$n_e \sin(i_e) = \sin(I_e)$$

$$n_o \sin(i_o) = \sin(I_o)$$

En tenant compte de l'approximation des petits angles :

$$\sin(I_e) \approx n_e i_e = (n_e - n_o) \cdot \tan(\alpha) \approx I_e$$

$$\sin(I_o) \approx n_o i_o = (n_e - n_o) \cdot \tan(\alpha) \approx I_o$$

L'angle entre les deux rayons a pour valeur :

$$I_e + I_o = 2(n_e - n_o) \cdot \tan(\alpha) = \epsilon$$

>Solution n°3 (exercice p. 43)

Le rayon de la tache d'Airy dû à l'objectif a pour valeur dans son espace objet :

$$r = 1.22 \frac{\lambda}{2 \cdot NA} = 1.22 \cdot \frac{0.55}{2 \cdot 0.80} = 0.42 \mu m$$

ce qui correspond à un rayon angulaire dans son espace image de :

$$\frac{r}{f'} \approx 10^{-4} rad$$

qui conduit donc à un écart angulaire nécessaire entre les deux rayons ordinaire et extraordinaire de :

$$\epsilon = \frac{2}{3} \frac{r}{f'} \approx 0.7 \cdot 10^{-4} rad$$

d'où un angle pour le prisme de :

$$\alpha = \arctan\left\{\frac{\epsilon}{2(n_e - n_o)}\right\} \approx 55 \cdot 10^{-4} rad \approx 0.2^\circ$$

>Solution n°4 (exercice p. 44)

L'angle ϵ étant petit, la distance d entre les deux rayons est sensiblement égale à : $f'_{obj} \cdot \epsilon$

Attention

f'_{obj} représentant la distance focale du condenseur. La distance d est toujours très faible, elle reste inférieure à la limite de résolution de l'objectif afin de ne pas discerner le dédoublement de l'image ; elle est de l'ordre d'une fraction de micromètre.

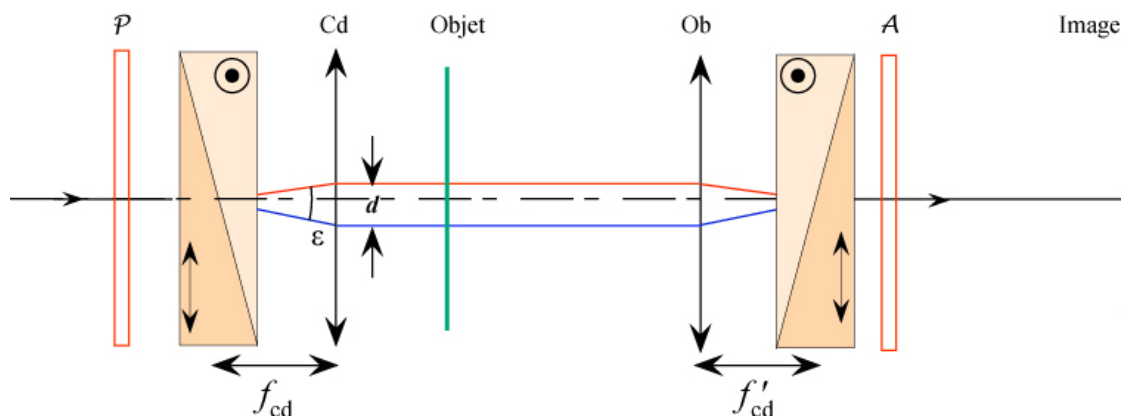


Figure 5 : Décalage transversal des rayons ordinaire et extraordinaire après la traversée d'un prisme de Wollaston dans un microscope à contraste interférentiel en transmission.

>Solution n°5 (exercice p. 44)

En tout point x de l'objet où existe une différence de marche, la variation de la différence de marche entre le rayon ordinaire et extraordinaire décalé de d a pour valeur :

$$\Delta(x) = \delta\left(x + \frac{d}{2}\right) - \delta\left(x - \frac{d}{2}\right) = \delta'(x) \cdot d$$

où $\delta'(x)$ représente la dérivée de la différence de marche. Pour illustrer le propos on considère un milieu homogène d'indice n , d'épaisseur constante e sauf sur une zone d'épaisseur e' où l'indice est égale à $n' > n$. Sur la figure 6 est représentée la différence de marche en fonction de la position x au niveau de l'objet, en rouge est tracé cette même différence de marche pour le rayon extraordinaire et en bleu pour le rayon ordinaire décalés de $\pm d/2$; enfin en vert est représentée la différence des deux différences de marche correspondant au deux rayons qui interfèrent au niveau du plan image.

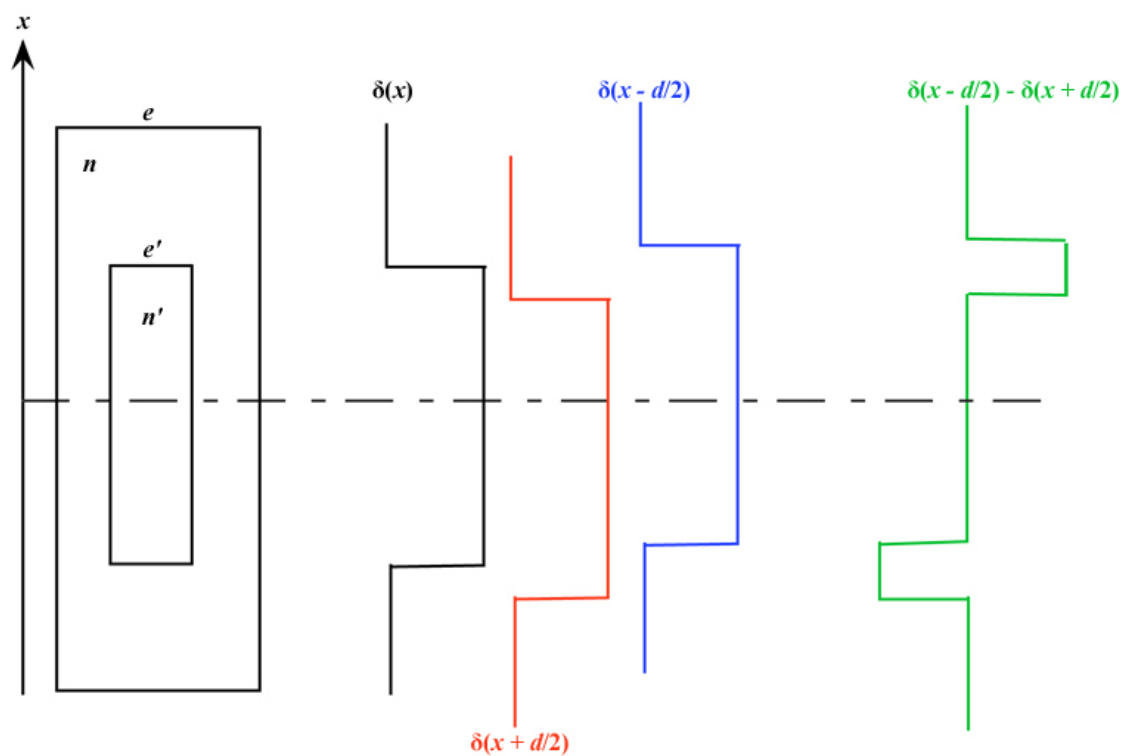


Figure 6 : Le contraste interférentiel met en relief les gradients des variations de phase.

Attention

La différence de marche mise en évidence par les interférences est donc une fonction linéaire de la pente de la différence de marche introduite par l'objet. On ne visualise donc pas les variations de phase mais celles de son gradient.

Glossaire

Dispositifs

Il est à noter que ces dispositifs sont usuellement mis en œuvre sur des microscopes de moyen ou haut de gamme qui utilisent actuellement le plus souvent des objectifs corrigés pour une longueur de tube infinie. Les schémas donnés dans ce grain considéreront toujours ce cas, avec 'lentille' de tube incorporée dans le statif...

Georges Nomarski

Ancien chercheur de l'Institut d'Optique (de Paris, maintenant Palaiseau). 1919-1997.

Lentille

de l'anglais '*Bertrand lens*'. Le terme usuel en français de '*lentille*' de **Bertrand** est abusif, car ce composant sera souvent plus complexe, au minimum un doublet pour corriger les aberrations, en particulier chromatiques.

Les deux prismes sont taillés parallèlement

Quand l'axe optique est contenu dans le plan du dioptre on dit que le cristal est taillé parallèlement .

Tiente de Newton

La dispersion des matériaux (dépendance des indices principaux du matériau biréfringent avec la longueur d'onde) conduit, en toute rigueur, à un spectre cannelé légèrement différent de celui conduisant stricto sensu aux teintes de Newton. Toutefois cette dispersion est suffisamment faible dans la plupart des cas pratiques pour que cet effet soit imperceptible sur les couleurs perçues.

Bibliographie

[Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées] NOMARSKI G. WEIL A.R., *Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées*, -, -, 1955, *Revue de Métallurgie*, vol. 52.

[Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées] NOMARSKI G., WEIL A.R., *Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées*, -, -, 1955, *Revue de Métallurgie*, vol. 52.

[Determination of fringe order in white-light interference microscopy] DE GROOT P. ET AL., *Determination of fringe order in white-light interference microscopy*, 08- 2002, *Appl.Opt.*, 41(22), p.4571-4578.

[Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur (tome R7)] ROBLIN G., *Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur (tome R7)*, *Techniques de l'Ingénieur*, -, 1999, *Microscopie optique* (p.tome R7 R6712 (+ R6710 + R6714)).

[Interferometric back focal plane microellipsometry] FEKE G.D. ET AL., *Interferometric back focal plane microellipsometry*, -, 04- 1998, *Appl.Opt.*, 37(10), p.1796-1802

[Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie] GOODMAN JOSEPH W., *Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie*, Traduction française de "Introduction to Fourier Optics", MASSON & Cie, Paris, 1972 (2006 3ème éd. anglaise).

[Le contraste de phase en optique et en microscopie] FRANÇON M., *Le contraste de phase en optique et en microscopie*, Édition de la revue d'optique théorique et instrumentale, -, 1950.

[Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel.] FRANÇON M., *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel.*, Édition du CNRS, -, 1954.

[Optical Shop Testing] MALACARA D. (EDITOR), *Optical Shop Testing*, Wiley, -, 2007, Chapter 14. Phase Shifting Interferometry (J H Bruning and H Schreiber).

[Optical Shop Testing] MALACARA D. (EDITOR), *Optical Shop Testing*, Wiley, -, 2007, Chapter 4. Lateral Shear Interferometers (M Strojnik G Páez and M Mantravadi). +Chapter 3. Common-Path Interferometers (D Malacara and S Mallick)., Autres....

[Optics of anisotropic layered media: a new 4×4 matrix algebra] YEH P., *Optics of anisotropic layered media: a new 4×4 matrix algebra*, -, -, 1980, *Surface Science*, vol. 96, p.41-53.

[Optique instrumentale Optique de Fourier] SURREL JOËLLE, *Optique instrumentale Optique de Fourier*, Ellipses, Paris, 1996.

[Polarisation de la lumière] HUARD SERGE, *Polarisation de la lumière*, MASSON & Cie, Paris, 1993.

[Principles of Optics] BORN MAX, WOLF EMIL, *Principles of Optics*, 7th Ed., PERGAMON PRESS, Oxford - New York - Toronto - Sydney - Paris - Frankfurt, 1999.

[Progrès récents en optique cohérente: filtrage des fréquences spatiales, holographie] LOWENTHAL S. BELVAUX Y., *Progrès récents en optique cohérente: filtrage des fréquences spatiales, holographie*, -, -, 01- 1967, *Revue d'optique théorique et instrumentale*, 46(1), p.1-64.